



**Ministero dell'Istruzione,  
dell'Università e della Ricerca**



**Università degli Studi  
di Palermo**

# **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO**

**Dipartimento di Scienze per la promozione della salute “G. D'Alessandro”  
Settore scientifico disciplinare Biochimica BIO/10**

**Dottorato di ricerca in Scienze e Tecnologie Diagnostiche in ambito Biomedico  
XXIII ciclo**

## **Biotechnologie applicate a studi pre-clinici di medicina rigenerativa e terapia genica**

**Dottoranda**  
Rosalia Di Stefano

**Tutor**  
Prof. Antonino Bono

**Coordinatore**  
Prof. Vito Franco

# Indice

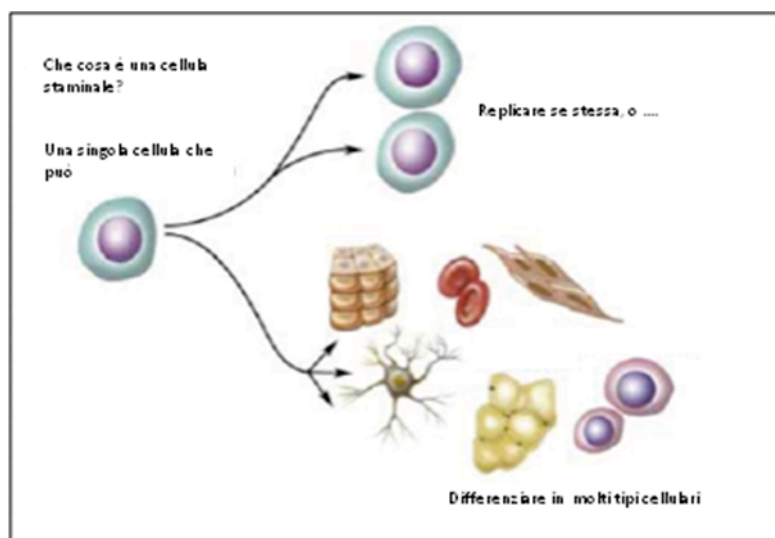
<b>Introduzione</b>	<b>Pagina</b>
Le cellule staminali	4
HSC e Medicina Rigenerativa	7
Fonti di HSC	8
Medicina rigenerativa con cellule geneticamente modificate : Terapia genica	11
<b>Scopo del progetto</b>	15
<b>Materiali e metodi</b>	17
<b>Risultati</b>	30
- Parte I :Ottimizzazione delle condizioni di trans-infezione	31
- Parte II: Espansione ex vivo di cellule HSC da sangue di cordone ombelicale alla nascita.	38
<b>Discussione</b>	47
<b>Bibliografia</b>	50

## *Introduzione*

## Le cellule staminali

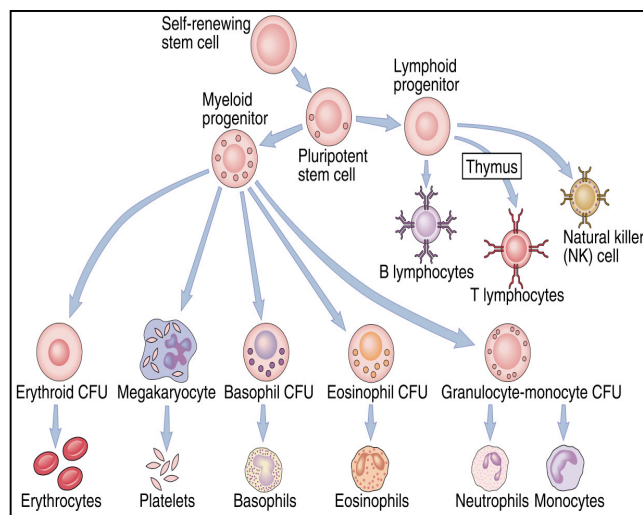
Le cellule staminali sono cellule in grado di dare origine a più tipi cellulari ed a seconda del loro potenziale differenziativo si possono distinguere in: cellule staminali embrionali, dette anche totipotenti, perché in grado di dare origine a tutti i tipi cellulari di un organismo adulto; cellule staminali pluripotenti, come le cellule staminali ematopoietiche/ mesenchimali, che hanno già un potenziale più limitato perché non possono dare origine ad un intero individuo, ma soltanto ad alcune linee cellulari del loro tessuto embrionali di origine; ed infine le cellule staminali multipotenti, alle quali appartengono le cellule staminali adulte ( Young et all. 2004), che sono cellule tessuto specifiche che intervengono per riparare eventuali danni al tessuto stesso.

Tutte le cellule staminali sono caratterizzate oltre che dalla capacità di differenziare verso più linee cellulari anche dalla capacità di andare incontro ad una **divisione asimmetrica**, attraverso la quale si genera una cellula figlia identica a se stessa (auto-mantenimento o self-renewal FIG1) che assicura il mantenimento della popolazione staminale per tutta la vita di un individuo.



**Fig.1.** Divisione asimmetrica delle cellule staminali

Tra le cellule staminali pluripotenti troviamo le Cellule Staminali ematopoietiche (HSC), residenti prima della nascita nel sacco vitellino, nel fegato fetale e nella milza, e dopo la nascita nel midollo osseo delle ossa lunghe e piatte (es. femore, tibia, sterno costole). Le HSC sono cellule in grado di differenziarsi nelle cellule del sangue in un processo chiamato EMOPOIESI O EMATOPOIESI ( Fig. 2).



**Fig.2.** Ematopoiesi delle cellule staminali (da Abbas et al.1999)

Le HSC sono mantenute in una speciale microambiente del Midollo Osseo (BM) chiamato “nicchia” che provvede a fornire tutti i nutrienti e gli stimoli chemiotattici necessari per il mantenimento omeostatico delle HSC (Takizawa H et al.2011). Il destino delle HSC, differenziamento e self renewal, è finemente regolato da una serie di fattori intrinseci come molecole segnale, o fattori di trascrizione, e da fattori estrinseci del micro-ambiente, come citochine e molecole di adesione (Wilson A. et al. 2006).

La staminale ematopoietica quando inizia il suo percorso differenziativo, matura in una cellula della linea mieloide che darà origine a globuli bianchi rossi, globuli bianchi e piastrine o alla linea linfoide che genera i linfociti.

Questo percorso deve essere altamente efficiente , ma al contempo plastico e regolato, in funzione delle necessità dell'organismo di sopperire ai vari compiti ai quali gli elementi figurati del sangue sono deputati. L'emopoiesi è regolata oltre che dal micro-ambiente in cui si sviluppano le HSC, anche da molecole solubili , chiamate citochine ematopoietiche, che vengo prodotte anche da altri organi in risposta a vari stimoli come infezioni, carenza di ossigeno etc. Le citochine si legano a specifici recettori di membrana per guidare il destino della staminale controllando la sopravvivenza e l'espansione delle cellule staminali attraverso l'attivazione di fattori di trascrizione diversi a seconda delle necessità.

## HSC e Medicina Rigenerativa

Grazie alle loro caratteristiche le HSC sono da tempo utilizzate in medicina rigenerativa. Storicamente le HSC sono state utilizzate per ricostituire il sistema omologo, come nei trapianti di Midollo Osseo. Più recentemente esse sono sfruttate per la riparazione di altri tipi di tessuti danneggiati, grazie alla possibilità delle biotecnologie di differenziare in vitro queste cellule in altri tipi cellulari (trans differenziamento per es. le HSC possono trans-differenziare in epatociti, cellule muscolari, epiteliali, neuronali, miocardiche etc.). Infatti l'uso delle cellule staminali a scopi terapeutici è oggi una delle grandi promesse della medicina moderna.

Il primo tentativo di trapianto di midollo osseo si deve ad un medico francese (Georges Mathè), che nel 1959 tentò di curare alcuni tecnici di un impianto nucleare il cui midollo osseo era stato danneggiato dall'esposizione accidentale alle radiazioni ionizzanti; purtroppo il tentativo non ebbe buon esito. Soltanto dieci anni più tardi si riuscì ad effettuare per merito del dott. Good il primo trapianto in un bambino di 5 anni affetto da una grave immunodeficienza. Si deve comunque al Dott. Thomas il merito di portare questa metodologia a protocollo clinico vero e proprio con enormi vantaggi terapeutici specialmente nel campo oncologico in presenza di gravi aplasie. Le HSC sono usate anche nei trapianti di midollo nel caso di leucemie, dopo trattamento ablativo con chemioterapici, nel caso di altri tumori laddove il midollo osseo è stato danneggiato dal trattamento citostatico, o leucemie, anemie emolitiche gravi o immunodeficienze congenite.

Si parla di **allotrapianto** nel caso in cui le HSC sono isolate da un donatore compatibile per ricostituire il sistema immunitario del ricevente. Nel caso in cui si utilizzano le cellule dello stesso paziente, che diventa pertanto donatore oltre che ricevente del trapianto, si parla invece di **autotrapianto**.

Il vantaggio dell'allotrapianto sta nel fatto che il nuovo sistema immunitario si origina da un donatore sano, e quindi si hanno maggiori benefici in termini di guarigione. Tuttavia i rischi correlati a tale procedura sono molto elevati quando non si utilizza un donatore compatibile (HLA identico), perché il nuovo sistema immunitario riconosce come estranei i tessuti del paziente aggredendoli, in questo caso si parla di malattia da trapianto verso l'ospite (GVHD), malattia che deve essere tenuta sotto controllo con farmaci immunosoppressivi.

Al contrario nel caso dell'autotrapianto non esistono rischi di GVHD, ma si incorre nella probabilità di recidive, in quanto le HSC autologhe trapiantate possono contenere una quota, seppur minima, del clone che aveva originato la malattia.

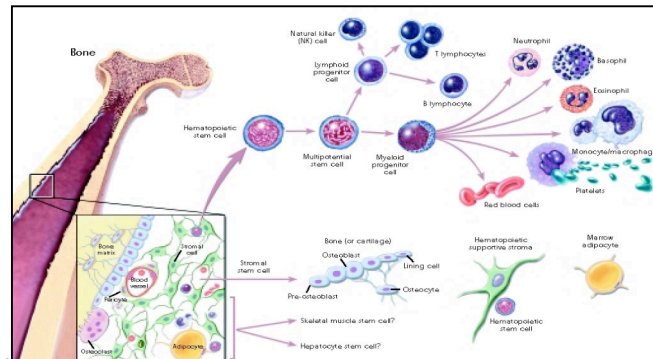
#### Fonti di HSC.

Fino dalla prima metà degli anni 80 il midollo osseo rappresentava l'unica sorgente di HSC per i trapianti allogenici e autologhi. A partire dalla seconda metà degli anni 80, molti gruppi hanno dimostrato che le cellule staminali potevano essere raccolte dal sangue periferico (PBSC) dopo stimolazione con fattori di crescita (come GM-CSF, GC-CSF) che promuovono la proliferazione e la mobilitazione dal midollo al circolo sistemico (Fig.3). Questa procedura, oltre che essere meno invasiva rispetto al midollo osseo ha altri vantaggi quali un maggior numero di HSC circolanti (a seguito di mobilitazione) e un attecchimento più rapido.

Più recentemente cominciano ad entrare nell'uso di trapianti di midollo osseo le HSC che si trovano nel sangue del cordone ombelicale (CB) alla nascita. Questo materiale è facilmente reperibile e viene usualmente scartato assieme alla placenta. Questa vasta disponibilità di HSC, aumentando grandemente la

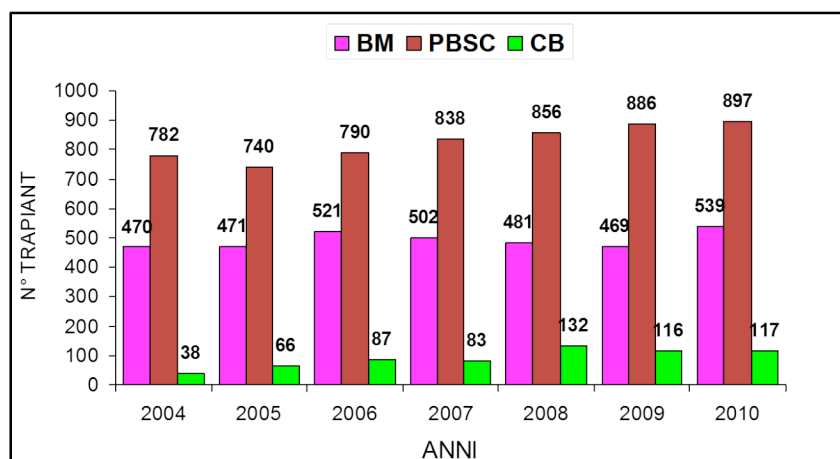


probabilità di compatibilità, ha generato la nascita di diverse Banche di crio-preservazione di CB.



**Fig 3** Mobilizzazione delle cellule staminali ematopoietiche (HSC)

Il primo trapianto di HSC prelevate da cordone ombelicale venne effettuato nel 1989 tra due fratelli e solo nel 1993 da un donatore estraneo (Gluckman E et al. 1989; Kurtzberg J et al. 1996) da allora c'è stato un rapido aumento nell'uso di tale fonte per trattare pazienti che non hanno un donatore compatibile di midollo o di PB (fig. 4)



**Fig.4.** Andamento dell'uso delle diverse fonti di HSC nel corso degli anni

Oltre alla facile reperibilità di questo materiale, un altro vantaggio del CB rispetto al midollo osseo è che grazie al minor potenziale immunogeno, probabilmente dovuto all'imaturità del sistema, possono essere utilizzati

cordoni non compatibili per 1 o 2 alleli HLA senza riscontrare alcuna differenza in termini di attecchimento, GVHD e sopravvivenza (Hwang WY et al. 2007; Sasazuki T et al. 1998; Petersdorf EW et al. 1998; Inoue H. et al. 2003). Inoltre le HSC da CB, pur essendo in numero minore rispetto al BM, possiedono una maggiore percentuale della subpopolazione più immatura (Cd34+/CD33-; CD34+/CD38-) e un maggiore potenziale clonogenico (Ueda et al. 2000) come dimostrato in esperimenti di ricostituzione del midollo osseo in topi NOD/SCID irradiati.

Nonostante questo, il numero esiguo delle HSC che sono contenute nella sacca cordonale costituisce ancora la maggiore limitazione all'utilizzo su vasta scala di questa fonte, specialmente quando si deve ricostituire il sistema ematopoietico in un individuo adulto. Per tale motivo oggi vengono effettuati trapianti di HSC da CB utilizzando due unità cordonali anche nei pazienti adulti (Barker J N et al. 2005, Sideri A. et al. 2011).

Per superare questo problema in questo ultimo decennio sono stati condotti diversi studi con l'intento di espandere le HSC in sistemi *in vitro*, ma non tutti questi studi sono completi nell'analisi dei potenziali di staminalità *in vitro* ed *in vivo* (nel modello animale).

In linea generale sono necessari, oltre ai nutrienti e alle condizioni di pH e di salinità idonee, anche alcune citochine che sono elettive delle cellule staminali, che cioè mantengono la cellula pluripotente. La maggior parte degli studi suggerisce di utilizzare **SCF** (stem cell factor che lega c-kit) **FL3** (ligando di flt-3/flk2) entrambi segnali di proliferazione delle HSC; e **TPO** (trombopoietina, ligando di c-mpl) responsabile dell'espansione delle HSC primitive (Gammaitoni L et al. 2003), in concentrazioni variabili tra 50-100 ng/μl e qualcuno riporta l'aggiunta di IL3 e IL6. Oltre allo stimolo da citochine si può influenzare la proliferazione delle HSC agendo sul pattern di segnalazione di Notch, in particolare si rendono costitutivamente espressi un

gruppo di geni (HES 1 e HES 5) attraverso il legame di Delta-1 con Notch (Delaney C. et al. 2010) impedendo il differenziamento.

Sono stati condotti alcuni trial clinici (Shapall et al. 2002) nei quali venivano utilizzate due unità di CB, di cui 1 non manipolata ed una espansa, questi primi trial sono stati disegnati al fine di dimostrare la fattibilità e la sicurezza (trial di fase I) di questa metodologia. Diversi cocktail di citochine, o terreni di base o additivi vari hanno portato risultati a volte controversi e non sempre completi dal punto di vista della misura del grado di amplificazione o del grado di staminalità.

### Medicina rigenerativa con cellule geneticamente modificate: Terapia Genica

La Terapia Genica (TG) è una terapia innovativa che ha lo scopo di modificare le cellule di un paziente al fine di correggere un difetto genetico o di impartire alla cellula nuove funzioni a scopo terapeutico. La TG può essere fatta *in vivo*, laddove il materiale genetico viene introdotto in cellule in situ o per via sistemica, o *ex vivo*, laddove è possibile l'espanto delle cellule bersaglio, la manipolazione in provetta ed il reimpianto nel paziente. Nell'ultimo caso sono comprese le cure genetiche di malattie la cui cellula bersaglio è la HSC ed il vettore di elezione è il retrovirus (oncoretrovirus e lentivirus).

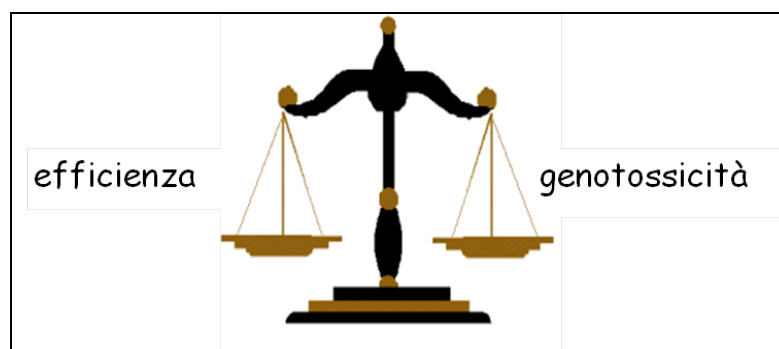
Ad oggi diversi trial clinici di TG sono stati condotti per curare questo tipo di patologie tra cui:

- adrenoleucodistrofia (X-ALD) (Cartier N et al 2012)
- malattia granulomatosa cronica (X-CGD), (Ott et al. 2006)
- malattie d'immunodeficienze gravi (SCID-X, ADA) (Cavazzano-Calvo et al. 2000)
- malattie da accumulo lisosomiale

- beta talassemia. (Cavazzano-Calvo et al.2010)

Le biotecnologie diagnostiche sviluppate in questa tesi sono applicabili a protocolli clinici di terapia genica in cellule HSC mediata da vettori lenti virali, che si integrano stabilmente nel genoma della cellula.

Questa caratteristica propria dei Retrovirus ( gamma-retrovirus e lentivirus) e degli Herpes virus , se da un lato ha il vantaggio di correggere permanentemente le HSC ed assicurare una terapia duratura, dall'altro ha lo svantaggio di potere incorrere in oncogenesi inserzionale, dovuta all'attivazione di oncogene cellulari vicini al sito d'integrazione. Per questo motivo è raccomandato dagli organi di controllo ( ENEA Europa, FDA in USA) di limitare il numero di copie di vettore per cellula ha massimo 1 o 2. D'altro canto nel caso di alcune malattie come le beta talassemie la correzione genetica di un esigua percentuale di HSC porterebbe ad un chimerismo, di cellule corrette e non, inefficiente ai fini terapeutici perciò è indispensabile trovare le condizioni ottimali per corregger il maggior numero di cellule con il minor numero di vettori (Fig 5).



**Fig5.** Equilibrio tra efficienza di trans-infezione e genotossicità necessario per una Terapia Genica efficace e sicura  
(elaborato personale)

Le  $\beta$ -talassemie sono malattie ereditarie a trasmissione autosomica recessiva, causate da mutazioni che determinano la diminuzione o l'assenza della sintesi

della catena beta globinica . L'eccesso delle catene alfa che compongono il tetramero della beta globina adulta ( $HbA, \beta_2 \alpha_2$ ) precipita all'interno del globulo rosso, determinandone una distruzione precoce con conseguente anemia ipocromica e microcitica. A causa dell'anemia il paziente necessita di periodiche trasfusioni di sangue per tutta la vita , accompagnate da terapia ferro-chelante per evitare l'accumulo di ferro negli organi, specialmente nel fegato, nel cuore e nelle ghiandole del sistema endocrino. L'unico trattamento curativo è il trapianto allogenico di midollo osseo, ma è limitato alla possibilità di trovare un donatore HLA compatibile ed è quindi applicabile ad un numero ridotto di pazienti (25%). Inoltre il trapianto allogenico, come già detto sopra, è associato ad un alto tasso di mortalità (superiore al 10%) dovuto a complicanze immunologiche (insorgenza di GVHD) o ad infezioni conseguenti all'aplasia midollare.

La correzione genetica delle HSC è una prospettiva attraente per la cura di questa malattia e negli ultimi dieci anni sono stati sviluppati vettori lentivirali ricombinanti per il gene della beta globina umana che hanno curato la malattia nel modello animale (topo) ( May C. 2000; Rivella 2003) e che hanno corretto i parametri funzionali nelle cellule eritroidi dei pazienti in coltura (Puthenveetil G et al 2004).

Questa terapia è applicabile in teoria a tutti i pazienti in quanto consiste nel trapianto autologo delle HSC geneticamente modificate *ex-vivo*, da vettori lentivirali che si integrano stabilmente nel genoma della cellula ospite e che è pertanto duratura. Come già accennato il successo di questa terapia dipende da un efficiente trasferimento genico, da un'efficace trascrizione del trans-gene e dal numero di copie di vettore integrate nel genoma cellulare al fine di minimizzare al massimo il rischio di oncogenesi inserzionale.

Il primo trial di terapia genica francese per la cura delle beta talassemia ha dimostrato la fattibilità di questa terapia avanzata, ma ha anche sottolineato gli attuali limiti (Cavazzana-Calvo et al 2010). Nel caso del primo paziente non

si è avuta una ricostituzione del midollo efficace ed il paziente è andato incontro a neutropenia ; per recuperare è stata necessaria l'infusione delle HSC non geneticamente modificate criopreservate come Backup. Pertanto la scarsa efficienza di traduzione (10% circa) e lo scarso numero di cellule infuse hanno determinato il fallimento terapeutico ed il paziente è ritornato ad essere trasfusione dipendente. Nel 2° paziente , un uomo di 19 anni con HbE/ $\beta^0$  talassemia , invece la terapia ha avuto successo in quanto dopo la ricostituzione ematologica è diventato trasfusione indipendente con 10 gr di Hb /dl (Hb/dl di base 4,5). Pertanto è evidenti che amplificare le cellule *ex vivo*, per renderle più permissive al vettore e nel contempo per limitare il numero di copie di vettore integrato per cellula, siano due fasi estremamente importanti per rendere la terapia efficace e sicura.

Scopo della tesi

Come riportato nella sessione dell'introduzione e come insegnato dal trial clinico francese è necessario rendere più permissive le HSC all'entrata del vettore per poter modificare il maggior numero di cellule HSC e contemporaneamente ridurre il numero di copie di vettore per cellula, per avere una terapia genica efficace e sicura; a tal fine durante questa tesi ho sviluppato delle metodologie per poter ottimizzare le condizioni di trans-infezione:

- espansione ex vivo delle HSC
- analisi citofluorimetrica dell'espressione di antigeni di superficie del differenziamento(CD38) e di staminalità (CD133) durante la coltura.
- Produzione di un plasmide ricombinante (GAG-Alb) per creare curve standard di riferimento per la Real Time PCR, per poter valutare il numero medio di vettore per cellula.

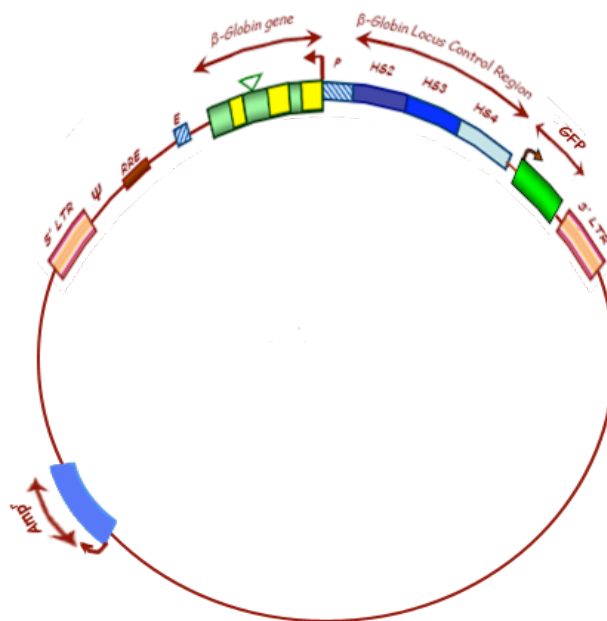


## *Materiali e metodi*

## PREPARAZIONE DEI VETTORI TNS9.3+GFP E LV-GFP

Lo stock virale viene ottenuto mediante co-trasfezione della linea cellulare 293T con tre plasmidi ricombinanti di cui uno contiene il vettore lentivirale TNS9.3+GFP o GFP, gli altri forniscono in trans le proteine necessarie alla produzione delle particelle virali (Dull et al., 1998).

### Vettore plasmidico TNS9+GFP



TNS9.3+GFP è il plasmide che contiene il vettore lentivirale. Esso contiene per la parte plasmidica di origine batterica:

- ✓ Origine di replicazione per E. coli
- ✓ Gene di resistenza all'ampicillina

Per le sequenze del transgene:

- ✓ Promotore del gene  $\beta$  - globinico umano, 660bp dal 5' del gene globinico umano.
- ✓ bp contenente il corpo (esoni ed introni) del gene  $\beta$  globinico, con una delezione di 375 bp (RSAI) di parte dell'introne II e la regione 3' UTR.
- ✓ la regione di 250bp localizzata al 3' del il sito di poliadenilazione e contenente un enhancer eritroide specifico(Kollias et al, 1987).

✓ Gli elementi core HS2(872bp), HS3(1300bp), HS4 (1061bp) della LCR del locus globinico umano

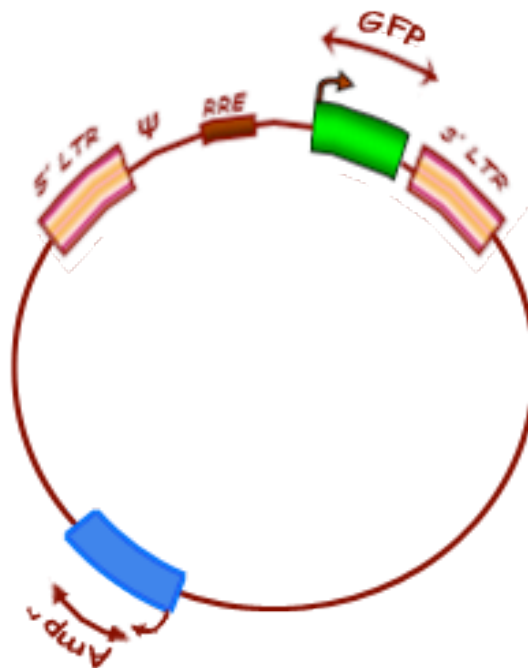
Per le sequenze virali:

✓ La sequenza RRE(857bp) per aumentare il titolo virale della produzione, in quanto è il sito di legame per la proteina Rev che facilita il trasporto degli mRNA, non andati incontro a splicing o parzialmente processati verso il citoplasma rendendo i trascritti più stabili.

✓ Le LTR(Long Terminal Repeat) del virus HIV1 con la 3' LTR mutata al fine di renderlo un vettore “self inactivated” (SIN vector) per delezione dell’enhancer virale della regione U3.

Il vettore plasmidico TNS9+GFP è stato costruito tramite l’inserzione della cassetta pgk-GFP(1200bp) all’interno del vettore TNS9 per poter condurre l’analisi clonale mediante citofluorimetria. Nella cassetta inserita il gene eGFP è sotto il controllo del promotore del gene che codifica la fosfoglicerato chinasi umana(hPGK).

### Vettore plasmidico LV-GFP



Il vettore LV-GFP (denominazione completa del plasmide: **pRRL SIN CPPT PGK GFP WPRE LTR**), è stato utilizzato nel corso dell’analisi clonale delle cellule trasdotte per testare gli effetti della mancanza della LCR globinica umana sull’espressione del transgene eGFP. Esso contiene le stesse sequenze del vettore TNS9+GFP tranne la cassetta gene  $\beta$  globinico-LCR: è presente il gene reporter (GFP) sotto il controllo del promotore della PGK umana, le

sequenze 3' e 5' Long Terminal Repeat (LTR) e alcune sequenze virali come pRRL (Rev responding element), CPPT (polypurine tract) e WPRE (Woodchuck Hepatitis post-transcriptional regulatory element).

Le cellule 293T. Vengono trans-infettate quando raggiungono una confluenza del 90%, in presenza di CaCl<sub>2</sub>, HBS, e di 10ug/piastra di plasmide TNS9.3 o GFP; 7,5ug/piastra di vettore 8.91; 2,5 ug/piastra di vettore VSVG.

Dopo 16 ore si blocca la reazione effettuando il cambio terreno. 24 e 48 ore dopo il cambio terreno il supernatante contenente i virioni prodotti viene prelevato, filtrato (filtri millipore, diametro 0,45um) e concentrato per ultracentrifugazione a 20.000 rpm per 90 min a 4° C. Infine il pellet virale ottenuto viene risospeso in 400 ul di x-vivo 15, aliquotato e criopreservato a -80° C.

Viene successivamente valutato il titolo virale in cellule HeLa mediante analisi citofluorimetrica e/o mediante Q-PCR.

### **VALUTAZIONE DEL TITOLO VIRALE SU LINEE CELLULARI HeLa o Mel**

Le cellule vengono contate e piastrate ad una concentrazione di 80.000 cellule per pozzetto (6 well) il giorno prima dell'infezione.

L'indomani si contano le cellule, si effettua il cambio terreno e 1-2 ore dopo si effettua la reazione di infezione usando 10 ul di preparato virale e 10ul di polibrene (c.f. 80 ug/ml). Si fanno delle diluizioni seriali 1:10 in 6 pozzetti e si incuba a 37°C al 5% di CO<sub>2</sub>.

Dopo 12 ore si effettua il cambio terreno e dopo 5 giorni le cellule vengono lavate in PBS e lette al citofluorimetro per valutare la percentuale di cellule GFP+.

Il calcolo del titolo virale viene effettuato nel seguente modo:

ip/ml = numero di cellule al momento della trasfezione X fattore di diluizione del virus X % cellule fluorescenti.

## **IMMUNOSELEZIONE DI CELLULE STAMINALI EMATOPOIETICHE CD34+**

I campioni di sangue di cordone ombelicale vengono diluiti 1:4 con 0,6 % ACD in PBS e stratificati su un gradiente di Ficoll-Hypaque (densità 1077g/ml). A seguito di centrifugazione a 1800 rpm per 15' si raccoglie l'interfase delle cellule mononucleate. Vengono effettuati due lavaggi con PBS-ACD. Il pellet cellulare viene risospeso in 10 ml di tampone di lisi 1X (NH<sub>4</sub>Cl 0,155 M; KHCO<sub>3</sub> 10mM) e incubato per 5' a temperatura ambiente al fine di lisare gli eventuali eritrociti contaminanti. Dopo centrifugazione a 1500 rpm per 10' il pellet viene risospeso in 10 ml di tampone di selezione (PBS -ACD 0,6% -BSA 0,5%) e fatto passare attraverso un filtro di preselezione di poliammide al fine di eliminare eventuali agglomerati cellulari che potrebbero interferire con la selezione. Si centrifuga a 1500 rpm per 10'. A questo punto viene effettuata l'immunoselezione secondo il kit di separazione MACS<sup>®</sup> (Miltenyi). Le cellule eluite vengono valutate mediante analisi citofluorimetrica per determinarne il recupero e la purezza, e criopreservate in terreno di congelamento ( $\alpha$ -medium, FBS (20%), L-glutammina (0,293 mg/ml), penicillina (100U/ml), streptomicina (100  $\mu$ gr/ml), DMSO (10%)).

Nel caso dei campioni di sangue aferetico si salta il passaggio in ficoll visto che l'aferesi rappresenta un ficoll naturale, si lisano le cellule con un tampone di lisi 1X (NH<sub>4</sub>Cl 0,155 M; KHCO<sub>3</sub> 10mM) incubando per 5' a temperatura ambiente. Dopo centrifugazione a 1500 rpm per 10' il pellet viene risospeso in 10 ml di tampone di selezione (PBS -ACD 0,6% -BSA 0,5%) e fatto passare attraverso un filtro di preselezione di poliammide e si procede allo stesso modo del campione di sangue cordonale.

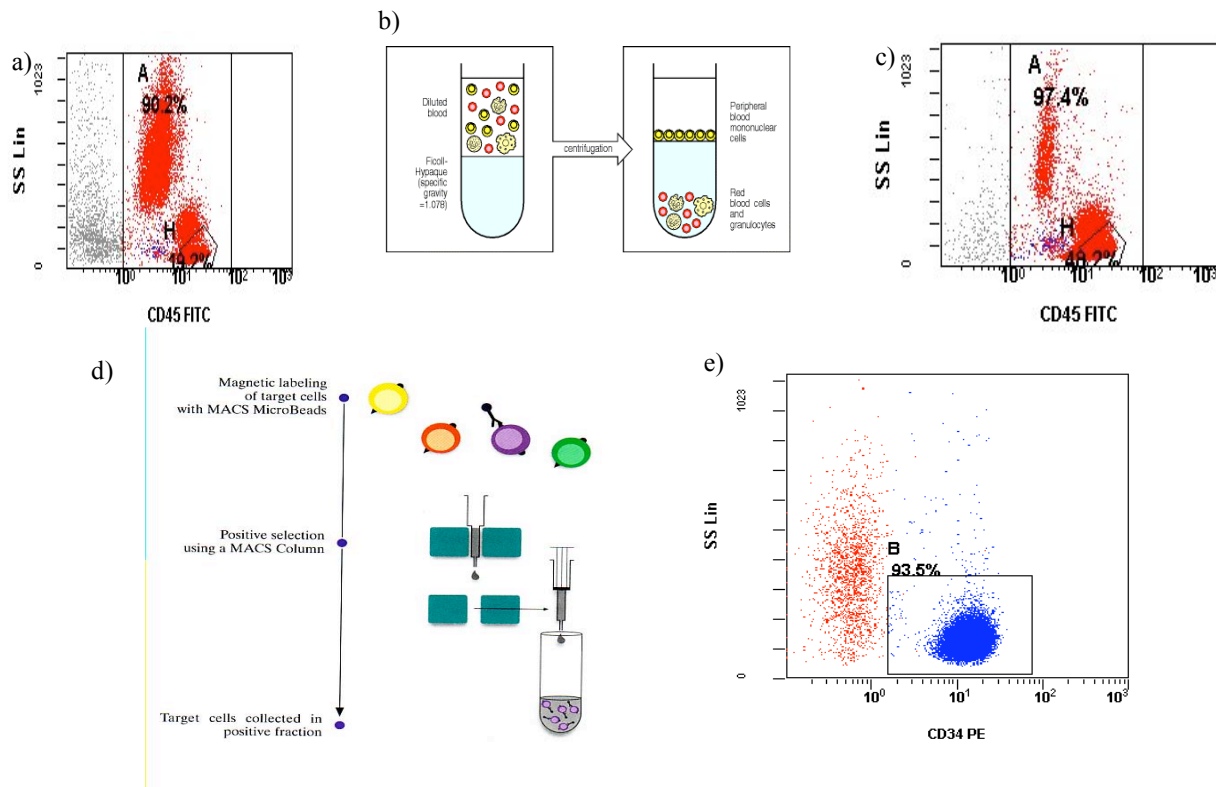


Fig.16: schematizzazione del processing del sangue cordonale, nell'esempio: a) analisi citofluorimetrica da campione di sangue, b) separazione delle cellule mononucleate mediante gradiente di ficoll, c) analisi citofluorimetrica sui mononucleati, d) immuno-selezione delle cellule CD34+ tramite biglie magnetiche, e) analisi citofluorimetrica dopo selezione.

## Prestimolazione delle HSC

Le cellule immuno-selezionate sono state contaminate alla camera di Burker e risospese in terreno di prestimolazione (Ex vivo<sup>TM</sup> media (Lonza), L-glutamina (0,293 mg/ml), penicillina (100U/ml), SCF (0.1ug/ul); Flt3 (0.1ug/ul); TPO (0.1ug/ul); IL-3 (20ng/ml) ) ad una concentrazione di  $2 \times 10^5$ /ml e incubate a 37°C al 5% di CO<sub>2</sub> per 24 h, per poi procedere alla trasduzione.

## Espansione delle HSC

Le cellule immuno-selezionate vengono contaminate alla camera di Burker e risospese in terreno di espansione Stem Span® SFEM ( StemCell Technologies) unito a antibiotico – antimitotico, e citochine Stem Span® CC110( StemCell Technologies) (Flt-3 ligand, SCF, TPO(R&D sistem)), ad una concentrazione di  $0,3 \times 10^6$  cells/ml e incubate a 37°C al 5% di CO<sub>2</sub>. Ogni due giorni di amplificazione viene effettuato un cambio terreno con citochine

fresche e viene valutato il numero di CD34+ con il kit Miltenyi, in base alle fluorosfere “Stem Count”, che permettono la conta assoluta delle CD34+, per seguire la crescita nel tempo. Al giorno 0, 4° ed 8° le cellule vengono prelevate per la marcatura per poter seguire l'espressione dei antigeni di superficie tra cui CD133-PE ( Miltenyi Biotec), antigene per le cellule staminali ematopoietiche espresso anche in altri tipi cellulari (sulla superficie apicale delle cellule epiteliali neuronali, epiteliali embrionali, sul tubulo prossimale del rene e sulle cellule staminali neuronali adulte) ; CD38-PE antigene di superficie del differenziamento espresso nei linfociti (T e B NK) plasmacellule, monociti e granulociti e piastrine e globuli rossi (megacariociti e precursori eritroidi); CD45-FITC pannello leucocitario identifica le cellule ematopoietiche mature ed immature ad eccezione dei megacariociti, delle piastrine, degli elementi del comparto eritroide, della maggior parte delle plasmacellule e degli isolati precursori ematopoietici “ alti”; CD34-ECD espresso in tutte le cellule precursori ematopoietiche, incluse le cellule staminali multipotenti. Vengono prelevate da 70000-100000 cellule marcate con 10 µl di CD133, CD38 e CD34 e 20 µl di CD45, incubate al buio per 20' e risospese in 300 µl di PBS 1X per bloccare la reazione per poi essere lette al Citofluorimetro. Negli stessi giorni di coltura vengono prelevate 1000 cellule CD34+ per l'Aferesi e 500 CD34+ per il campione da sangue cordonale risospeso in 100 µl di IMDM e piastrate in 5 ml di terreno semisolido di metilcellulosa contenente citochine ricombinanti necessarie sia per il differenziamento eritroide che mieloide.

Al 4° giorno di espansione le cellule vengono prelevate per la trans -infezione, che si effettua secondo il protocollo descritto qui di seguito.

## **PROTOCOLLO DI TRANS-INFEZIONE DELLE HSC**

Le cellule immuno-selezionate vengono contate alla camera di Burker e risospese o in terreno di prestimolazione o in quello di espansione.

Dopo 24 ore dalla prestimolazione o al 4° giorno di espansione ( vedi sessione espansione HSC) viene effettuata la prima trasduzione in piastre ricoperte di retronectina: le cellule vengono nuovamente contate, e risospese in 100 µl di terreno di prestimolazione fresco o terreno di espansione fresco. Le piastre a 24 pozzetti (non trattate per tessuti cellulari) sono state precedentemente trattate con 15 µg/cm<sup>2</sup> di retronectina (Takara). Dopo 2 ore di incubazione a temperatura ambiente si aspira la soluzione a base di retronectina e si lava con una soluzione di PBS-BSA (0,5%), incubando per 30'. Infine la soluzione viene aspirata, e le piastre vengono lavate 3 volte in PBS. Una volta contate le cellule si rimuove il PBS dalle

piastre e si aggiunge nell'ordine: terreno, sospensione cellulare, preparato virale (la quantità varia a seconda dell'MOI che si applica). Il volume finale della reazione di trasfezione è di 450  $\mu$ l. Si incuba per 8 ore, e si ripete il procedimento usando una dose di preparato virale fresco. Dopo 8 ore si interrompe la reazione di trasfezione effettuando il cambio terreno. Le cellule vengono contate e risospese in terreno eritroide o in metilcellulosa.

## **COLTURE PRIMARIE ERITROIDI IN FASE LIQUIDA**

Le cellule CD34<sup>+</sup> vengono risospese, ad una concentrazione di  $1 \times 10^6$ /ml, in un terreno di coltura contenente:  $\alpha$ -medium; 1% di BSA deionizzata; 1U/ml di eritropoietina ricombinante umana;  $10^{-5}$  M di 2-mercaptoetanololo;  $10^{-6}$  M di dexametasone; 0.3 mg/ml di holo-transferrina umana; 10 ng/ml di stem cell factor. Viene effettuato il cambio terreno ogni 5 giorni. Nell'arco di 14 giorni si possono seguire *in vitro* le varie fasi del differenziamento eritroide che avvengono normalmente *in vivo*.

## **COLTURE ERITROIDI IN METILCELLULOSA DI CELLULE CD34+**

Al fine di valutare l'espressione a livello clonale in cellule eritroidi umane e per rilevare se le cellule staminali CD34<sup>+</sup> trattate con il vettore, o amplificate sono in grado di generare cellule sia della linea eritroide che mieloide (mantenimento della staminalità) è stato utilizzato un sistema di coltura su un supporto semisolido (metilcellulosa) contenente citochine ricombinanti necessarie sia per il differenziamento eritroide che mieloide.

Le cellule CD34<sup>+</sup> estratte da campioni di aferesi di soggetti sani sono state risospese ad una concentrazione di  $8 \times 10^3$  cell/mL in terreno IMDM (Iscoe's Modified Dulbecco's Medium) addizionato con 2% FCS. La miscela contenente le cellule è poi stata aggiunta ad un terreno completo composto da metilcellulosa (MethoCult GF+ H4535, Stem Cell technologies), contenente diversi fattori di crescita emopoietici (circa 2000 cellule/ml per le cellule trasdotte, mentre circa 250 cell/ml per le cellule amplificate di modo da poter condurre una caratterizzazione fenotipica delle diverse colonie presenti a diversi giorni di coltura). Le cellule sono state piastrate in piastre da 35mm; successivamente le piastre sono state messe all'interno di un incubatore in atmosfera umidificata (5% CO<sub>2</sub>, 37°C). Dopo 14 giorni circa, le colonie (>50 cellule) e i cluster (<50 cellule) cresciuti, sono stati osservati al microscopio ottico invertito e valutati morfologicamente secondo il metodo descritto da Nissen-Druey



(Nissen-Druey et al., 2005), per distinguere tra colonie eritroidi mieloidi o per procedere nel caso delle cellule trasdotte con l'analisi de espressione a livello clonale.

#### **ANALISI D'ESPRESSIONE SU COLONIE ERITROIDI DA METIL-CELLULOSA:**

Al 15° giorno di coltura venivano prelevate, in modo casuale, circa 200 colonie eritroidi, venivano risospese in 1ml e suddivise in modo che 2/3 della colonia veniva usata per l'estrazione del DNA e successiva reazione di PCR per determinare la presenza del vettore e il restante 1/3 di colonia veniva letto mediante analisi citofluorimetrica (vedasi tecniche descritte successivamente).

#### **CONTA CELLULARE E VALUTAZIONE DELLA VITALITÀ' CELLULARE**

10 µl di sospensione cellulare omogenea vengono diluiti in 10 µl di colorante Trypan Blue e 30µl di soluzione fisiologica o PBS (fattore di diluizione = 5). Una goccia di tale preparato viene posta nella camera di Burker e si procedeva con la conta al microscopio: vengono letti almeno quattro diversi riquadri, si calcola la media delle cellule in ogni riquadro e tale valore, moltiplicato per il fattore di diluizione e per 10.000 dà il numero di cellule per ml di terreno. La percentuale di cellule vitali veniva così calcolata:  $n^{\circ} \text{ di cellule vive} \times 100 / n^{\circ} \text{ di cellule totali (vive + morte)}$ .

#### **ANALISI CITOFUORIMETRICA**

Per valutare la presenza di cellule CD34<sup>+</sup> è stato utilizzato lo Stem-Kit™ (Beckman-Coulter). Vengono prelevati 50 µl del campione da analizzare e vengono aggiunti 10 µl di anticorpi anti CD34/45. Si miscela il campione e si incuba la reazione per 20 ' al buio. Vengono successivamente aggiunti 2 ml di soluzione di lisi 1x per eliminare gli eritrociti presenti, si miscela la reazione e si lascia procedere la reazione per 10' al buio. Infine si aggiungono 50 µl di fluorosfere "Stem Count" che permettono la conta assoluta delle cellule CD34<sup>+</sup>. La marcatura con tali anticorpi va accoppiata alla marcatura con 7AAD per distinguere le cellule già morte. Questa stessa marcatura verrà effettuata a diversi giorni di coltura di espansione in terreno Stem Span® SFEM per stabilire il grado di espansione delle cellule staminali.

Per determinazione la percentuale delle cellule fluorescenti per la GFP, le cellule sono state lavate in soluzione fisiologica, risospese in PBS e lette al citofluorimetro (canale FITC), (Citomics FC 500, Beckman&Coulter).

Per valutare l'espressione di alcuni antigeni di superficie indicatori di staminalità, come CD133 o di differenziamento come CD38, vengono prelevate 70000-1000000 cellule al 4° ed 8° giorno di coltura, lavate con PBS 1X e marcate con gli anticorpi (10 µl CD133-PE, 10 µl CD34-ECD, 10 µl CD38-PC5 e 20 µl CD45-FITC) o di controllo isotipico, incubate al buio per 15', la reazione viene bloccata con l'aggiunta di PBS 1X e le cellule vengono lette al citofluorimetro.

### **ESTRAZIONE DI DNA**

Un'aliquota di cellule (minimo 2-300,000 cellule) viene prelevata per estrarne il DNA. Per ogni esperimento le cellule vengono di volta in volta pellettate e congelate a -20°C. L'estrazione di DNA viene poi effettuata contemporaneamente per tutti i campioni di un esperimento. Il pellet cellulare viene risospeso in 400ul di soluzione A (10mM tris-HCl pH8, 400mM NaCl, 2mM EDTA) e incubato o.n. in una PK solution (30ul SDS10%, 30 ul proteinasi K 10 mg/ml). Vengono aggiunti 400ul di soluzione di estrazione (fenolo-cloroformio-alcol isoamilico) e i campioni, vortexati, vengono centrifugati a 14.000rpm per 5'. Il DNA presente nella fase superiore viene fatto precipitare con l'aggiunta di 1ml di etanolo 100%. Si effettua poi un lavaggio con etanolo al 75% e, dopo aver fatto ben asciugare il pellet di DNA questo viene risospeso in un volume di circa 50ul, quantizzato allo spettrofotometro ( $A_{260}$ ) e analizzato su gel di agarosio all'1%.

### **COSTRUZIONI PLASMIDICHE.**

Per la determinazione del numero di copie di vettore integrate nelle cellule trasdotte tramite Q-PCR, era necessario costruire una curva standard. A tale fine ho costruito un plasmide per l'analisi nelle cellule umane contenente un frammento del gene che codifica per l'albumina, come controllo endogeno, ed un frammento di 2122bp del gene gag contenuto all'interno dei vettori lentivirali utilizzati nel corso degli esperimenti.

#### **Pgem Teasy-hAlb Gag**

è stato creato il vettore inserendo nel pGEM-Teasy (Promega) il prodotto di amplificazione di una reazione di PCR corrispondente ad una regione interna al gene umano *alb* (1051bp), in quantità vettore-inserito 1:3 molare eccesso.

Le condizioni d'amplificazione sono state: 400ng di DNA genomico proveniente da cellule K562 è stato sottoposto al seguente programma di amplificazione:

96°C  
96°C  
59°C  
72°C  
72°C

} X 30 Cicli

Primers utilizzati:

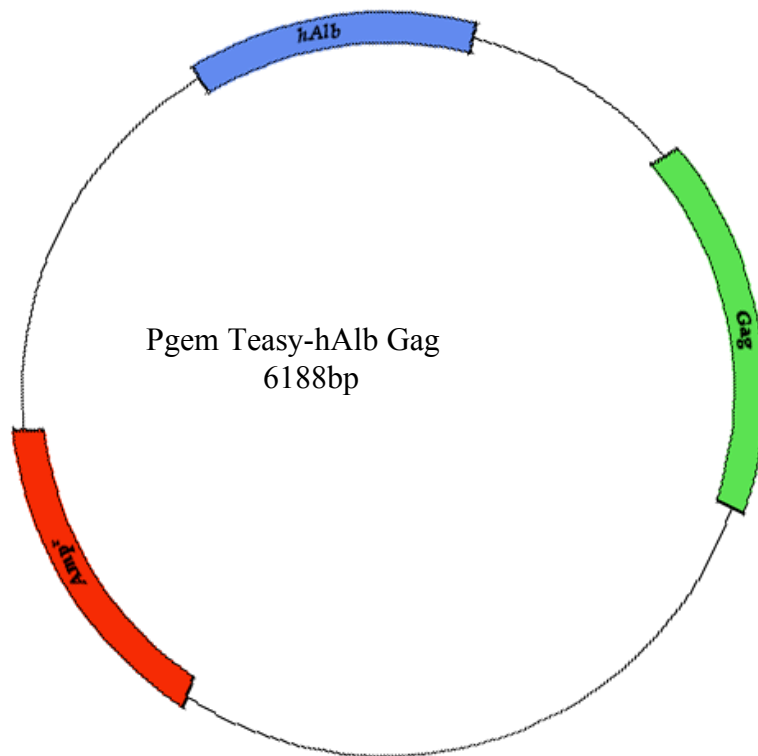
FW: 5'-CAGAAGGAAGTAATGTGTGT-3'

REV: 5'-TGTGATAGCAATAGGGAGTT-3'

L'utilizzo di questo plasmide bi-valente ha permesso di ridurre al minimo gli errori dovuti alla pipettatura ed alla quantizzazione. Esso, oltre alle sequenze del plasmide pGem Teasy, contiene:

- L'amplicone di gene *halb*(1051bp) ottenuto dalla reazione di PCR utilizzando i primers *halbfw* e *halbrev*.
- Il frammento PstI – NdeI di 2122bp del gene virale GaG, ottenuto dalla digestione enzimatica del vettore TNS9 con gli enzimi PstI e NdeI.

### Plasmide Pgem Teasy-hAlb Gag



#### **Quantizzazione assoluta del numero di copie di vettore integrate per cellula (VCN/Cell).**

Dopo aver analizzato tramite analisi Southern un limitato numero di cloni Mel e K562 trasdotti, ed avere individuato cloni a 1, 2 e 3 copie di vettore, questi sono stati utilizzati come DNA controllo per analizzare un gran numero di cloni con la metodologia della Q-PCR.

La quantizzazione del VCN/Cell è stata su cloni trasdotti mediante Real Time PCR utilizzando i seguenti primers:

hALB fw: 5'-TGAAACATACGTTCCCAAGAGTTT-3'

hALB prb: 5'-TGCTGAAACATTACCTTCCATGCAGA-3'

hALB rev: 5'-CTCTCCTTCTCAGAAAGTGTGCATAT-3'

Specifici per le cellule umane K562(gene endogeno halb)

GAG fw: 5'-GGAGCTAGAACGATTCGCAGTTA-3'

GAG prb: 5'-ACAGCCTTCTGATGTTTCTAACAGGCCAGG-3'

GAG rev: 5'-GGTTGTAGCTGTCCCAGTATTTGTC-3'

Specifici per le sequenze del vettore

Per la reazione di amplificazione vengono usate le seguenti condizioni:

2x Master Mix (taqman) 12,5ul

25uM primer 0,8 ul

2,5 uM probe 2,5ul

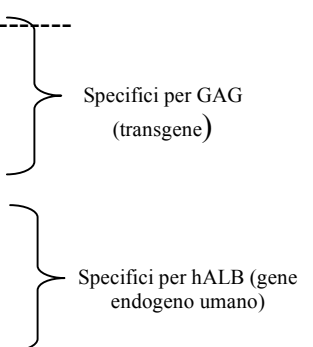
Dna 100ng (1-2ul)

H2O a 25ul

A tal fine è stata costruita una curva standard utilizzando il plasmide Pgem Teasy-hAlb Gag. L'utilizzo di questo plasmide bi-valente, contenente sia una regione del gene Gag che del gene codificante l'albumina umana, ha permesso di ridurre al minimo gli errori dovuti alla pipettata ed alla quantizzazione. Dopo la loro costruzione, le maxi-preparazioni di entrambi i plasmidi sono state accuratamente quantizzate mediante analisi spettrofotometrica condotta su tre diversi spettrofotometri e su un fluorimetro ad alta sensibilità (Qbit, Invitrogen). Nota la concentrazione, sono state costruite curve standard a partire da una concentrazione di  $10^7$  copie di plasmide/ $\mu$ l e diluizioni successive di un fattore 10 ( $10^7, 10^6, 10^5, 10^4, 10^3$  e  $10^2$  copie di plasmidi/ $\mu$ l).

Le curve così costruite sono state validate utilizzando i DNA genomici estratti da cloni umani trasdotti, il cui VCN era noto per mezzo di analisi Southern precedentemente effettuata.

Utilizzando queste curve, il VCN del DNA genomico dei cloni trasdotti con il vettore di nostro interesse è stato determinato con il seguente calcolo:

$$\text{VCN} = \frac{(\text{GAG mean quantity})}{(\text{Alb mean quantity}) : (\text{valore di ploidia delle cellule})}$$


Specifici per GAG (transgene)




Specifici per hALB (gene endogeno umano)

Il valore di ploidia delle cellule equivale a 2 per cellule CD34+, 3.9 per Hela.

*Risultati*

## **Parte I: Ottimizzazione delle condizioni di trans-infezione**

I lentivirus sono capaci d'infectare anche cellule non in divisione, come le cellule ematopoietiche, ma queste devono essere rese permissive, cioè indotte ad entrare in fase G1 del ciclo cellulare ( fig 6); questo si ottiene mediante prestimolazione con opportune citochine. Inoltre il titolo virale, il rapporto tra particelle virali e numero di cellule (MOI), i tempi di esposizione al virus etc. sono tutti parametri che incidono sull'efficienza di trans-infezione.

	transduction by:	
	lentivirus (HIV)	$\gamma$ -retrovirus (MLV)
<i>a</i> <b>proliferating cell</b> 	<b>yes</b>	<b>yes</b>
<i>b</i> <b>partially stimulated cell</b>  T cell in G <sub>1</sub>	<b>yes</b>	<b>no</b>
<i>c</i> <b>quiescent cell</b>  T cell in G <sub>0</sub>	<b>no</b>	<b>no</b>

**Fig.6** Condizioni cellulari necessarie per la trasduzione mediata da vettori lentivirali e  $\gamma$ -oncoretrovirali( tratto da M. Emerman. Nature Genetics 2000).

Al fine di migliorare i protocolli di trans-infezione delle cellule HSC, con vettori lentivirali, ho usato cellule CD34+ selezionate da pazienti con beta talassemia. Ho valutato l'efficienza del trasferimento genico di vettori lentivirali (LVGFP) contenenti il gene marcatore della Green Fluorescent Protein (GFP) variando diversi parametri: tempi d'espressione; dosi virali e cocktail di citochine necessari nella fase di pre-stimolazione. Le percentuali delle cellule trans-infettate venivano rivelate mediante analisi citofluorimetriche (% delle cellule GFP+)

ed il livello d'espressione del gene marcatore, mediante il valore dell'MFI (mean fluorescent intensity) . Il numero di vettori integrati per cellula venivano valutati mediante Q-PCR, dopo diversi giorni di coltura (12gg) in terreno di differenziamento eritroide.

I risultati ottenuti in queste analisi sono riassunti nella tabella 1.

Condizioni	cocktail di citochine	durata prestim (ore)	% cellule morte dopo prestim	MOI	dosi virali	durata somministr di ciascuna dose virale	% cellule GFP+
Cond #1	IL6 (60 ng/ul)	24	40%	30	1	24	9%
Cond #2	TPO (100ng/ul), SCF (100ng/ul), Flt-3(100ng/ul), IL6 (60 ng/ul)	24	27%	30	1	24	13%
Cond #3	TPO (100ng/ul), SCF (100ng/ul), Flt-3(100ng/ul), IL6 (60 ng/ul), IL3 60ng/ul	24	35%	30	1	24	27%
Cond #4	IL3 20ng/ul	24	40%	30	1	24	15%
Cond #5	TPO (100ng/ul), SCF (100ng/ul), Flt-3(100ng/ul), IL3 (20 ng/ul)	24	30%	30	1	24	20%
Cond #6	TPO (100ng/ul), SCF (100ng/ul), Flt-3(100ng/ul)	24	29%	30	1	12	10%
Cond #7	TPO (100ng/ul), SCF (100ng/ul), Flt-3(100ng/ul)	24	28%	30	1	24	12%
Cond #8	TPO (100ng/ul), SCF (100ng/ul), Flt-3(100ng/ul)	24	27%	30	2	12	13%
Cond #9	TPO (100ng/ul), SCF (100ng/ul), Flt-3(100ng/ul)	36	45%	30	1	24	6%
Cond #10	TPO (100ng/ul), SCF (100ng/ul), Flt-3(100ng/ul)	12	21%	30	1	24	12%

**Tabella 1:** Condizioni di trans-infezione utilizzate per l'esperimento

E suggeriscono che :

- La citochina IL-3 , in aggiunta alle citochine proprie delle cellule staminali (SCF, TPO, FL3), permette di ottenere un'efficienza di trans-infezione quasi doppia rispetto allo stesso cocktail di citochine in assenza di IL-3 ( 20 % nella Cond #5 vs 12% Cond #7). La sola citochina IL-3 risulta efficace ma in misura minore ( 15% Cond. # 4 ).
- IL- 6 da sola o in combinazione con altre citochine di staminalità non migliora l'efficienza di trasferimento genico ; ma in aggiunta al cocktail completo (Cond.#5) aumenta il numero di cellule GFP +, ma porta le cellule a differenziare più precocemente in coltura (dati non mostrati) e per tanto non è auspicabile un suo utilizzo.
- La permanenza del vettore a contatto con le cellule per 24h (Cond. #7) piuttosto che per 12h (Cond#6) è influente ai fini dell'efficienza di trans-infezione ; in entrambi i casi, a parità di protocollo, l'efficienza di trans-infezione è di circa il 10%. Questo suggerisce che il processo d'infezione avviene durante le prime ore e pertanto sembra inutile prolungare ulteriormente i tempi di esposizione delle cellule al virus .

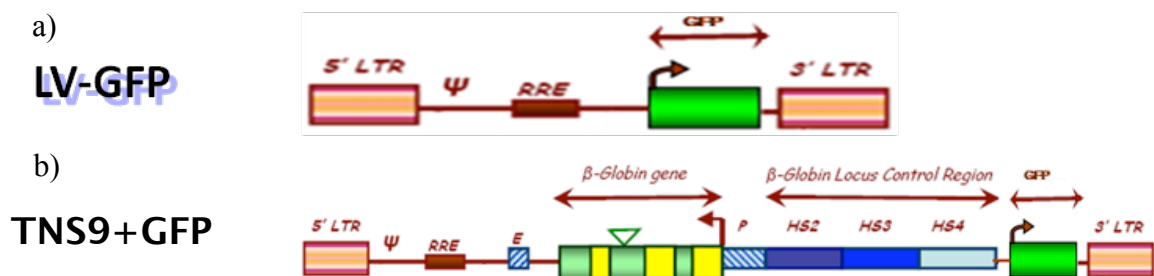


- La somministrazione di due dosi virali a distanza di 12 ore ciascuna , piuttosto che di una sola dose virale per 12 ore non determina un incremento dell'efficienza di trans-infezione (13% Cond#8 vs 12 % Cond. #7). La quota di cellule permissive al vettore rimane invariata e l'efficienza di trans-infezione non è limitata dal numero delle particelle virali, che risultano, pertanto, in eccesso anche con una sola dose virale. Quest'ultima considerazione è frutto anche dell'osservazione che crescendo il numero di particelle virali MOI 40,50,60 non aumenta notevolmente la % delle cellule trasdotte, ma piuttosto la tossicità della reazione (dati non mostrati).

Questi saggi hanno permesso di stabilire che le condizioni ottimali sono le seguenti:

- ✓ Cocktail di citochine: SCF, TPO e FL-3 (c.f. 100ng/ul), IL-3 (20 ng/ul)
- ✓ Durata prestimolazione: 12 ore
- ✓ Numero di dosi virali: 1
- ✓ m.o.i.: 30
- ✓ Tempo tra una dose virale e la successiva: indifferentemente 8 o 12 ore

Ho effettuato un altro esperimento di trans-infezione con le condizioni ottimali stabilite nell'esperimento precedente usando oltre che il vettore LV-GFP (7 kb di genoma) anche un altro vettore più complesso contenente, oltre al gene marcatore GFP, anche la cassetta di espressione della beta globina umana (TNS 9.3 + GFP) (Fig 7).



**Fig.7.**Rappresentazione schematica del vettore lentivirale ricombinante **a)** per la proteina GFP (LV-GFP)  
**b)** per la  $\beta$ -globina (TNS9+GFP).

In questo 2° esperimento ho messo appunto un sistema di analisi di PCR quantitativa che, basandosi sull'uso di un plasmide bivalente, contenente sia le sequenze virali GAG, che le sequenze controllo del gene endogeno Alb ( albumina umana) risulta più riproducibile.

Al 12° giorno di coltura eritroide è stata eseguita l'analisi del numero di copie di vettore per cellula mediante Real Time PCR su DNA genomico (Tabella 2), con primers e probe specifici delle sequenze virali . Si è scelto questo tempo di analisi dato che era stato osservato che questo era il tempo minimo necessario per escludere forme non integrate di vettore presente nel citoplasma cellulare nei primi giorni dopo la trans-infezione.

Virus usato	% cell GFP+ dopo trasduz	moi	dosi virali	durata di somministr di ciascuna dose virale (ore)	VCN
LV- GFP	31%	30	1	12	5
TNS9.3+GFP	12%	30	1	12	3.2

**Tabella 2.** Analisi del VCN/Cellule mediante Q-PCR.

I risultati suggeriscono che :

- ✓ Effettivamente a parità di MOI e di condizioni di trans-infezione il vettore con un genoma più grande ha maggiori difficoltà a stabilizzarsi all'interno del genoma della cellula ospite.
- ✓ Le cellule geneticamente modificate vanno da un massimo del 12% per il TNS 9.3 + GFP ad un 31 % per il LV-GFP.
- ✓ Il numero medio di copie di vettore all'interno delle cellule è molto alto 5 nel caso del LV-GFP e 3.2 nel caso del TNS 9.3+ GFP .Queste condizioni non sono ottimali ai fini di una terapia genica efficace e sicura , dove è richiesta un numero minore di vettore medio per

cellula ( da 1 a massimo 2 copie) con una maggiore percentuale di cellule modificate, al fine di rendere minimi i rischi di oncogenesi inserzionale, ma con un numero di cellule modificate sufficiente per ricostituire il midollo del paziente.

## **Parte II: Espansione ex vivo di cellule HSC da sangue di cordone ombelicale alla nascita.**

Come riportato nella prima parte le condizioni di trans-infezione settate consentono la modificazione di una limitata percentuale di HSC da adulto e con un numero di copie medio di vettore per cellula troppo elevato. Al fine di rendere le cellule HSC più permissive all'infezione abbiamo analizzato questi parametri in cellule in fase di divisione. In questo secondo set di esperimenti sono state usate cellule HSC da sangue di cordone ombelicale alla nascita, sia perché è una fonte più facilmente reperibile, sia perché uno degli scopi di questa tesi è quella di usarle come fonte per medicina rigenerativa e terapia genica. È stata valutata la possibilità di espandere HSC da sangue di cordone ombelicale in un terreno commerciale privo di componenti di origine animale e quindi suscettibile di essere usato in futuro in trial clinici. L'amplificazione è avvenuta in presenza di un cocktail di citochine (SCF, TPO, Flt-3) che mantengono le cellule allo stato indifferenziato.

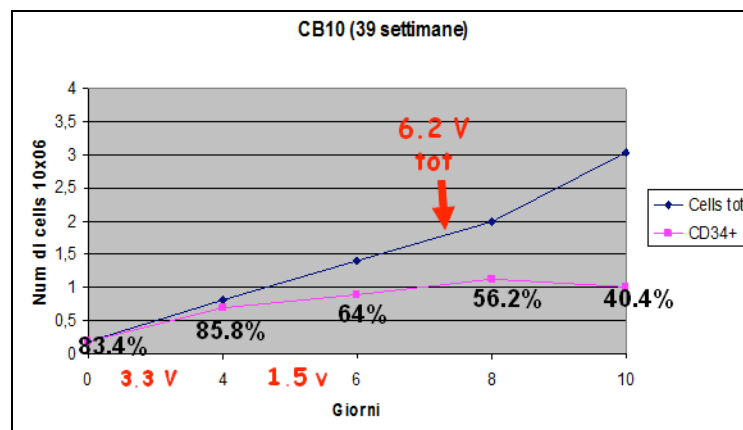
Le cellule CD34+ selezionate mediante biglie magnetiche coniugate con anticorpo anti-CD34+ sono state messe in coltura e a diversi giorni sono stati valutate sia come numero che come tipologia. I parametri valutati sono:

- ✓ La percentuale e il numero delle cellule CD34+, nonché il numero delle cellule totali.
- ✓ la vitalità, al microscopio ottico tramite colorazione con Trypan Blu e in citofluorimetria mediante colorazione 7AAD.
- ✓ Il fenotipo della popolazione CD34+ (mediante letture citofluorimetriche a canali multipli) per rilevare la co-presenza di altri marcatori precoci come CD133, che compare prima dello stesso CD34, o marcatori più tardivi come CD38, che compare durante le prime fasi del differenziamento ematopoietico.
- ✓ La percentuale di colonie generate da progenitori e sviluppate in supporti semisolidi di metilcellulosa completo di tutte le citochine che permettono la crescita di colonie più mature ( CFU-G ;CFU-M), come pure colonie più primitive ( BFU-E ; CFU-GM ; CFU-GEMM;)

### Analisi di espansione ex-vivo

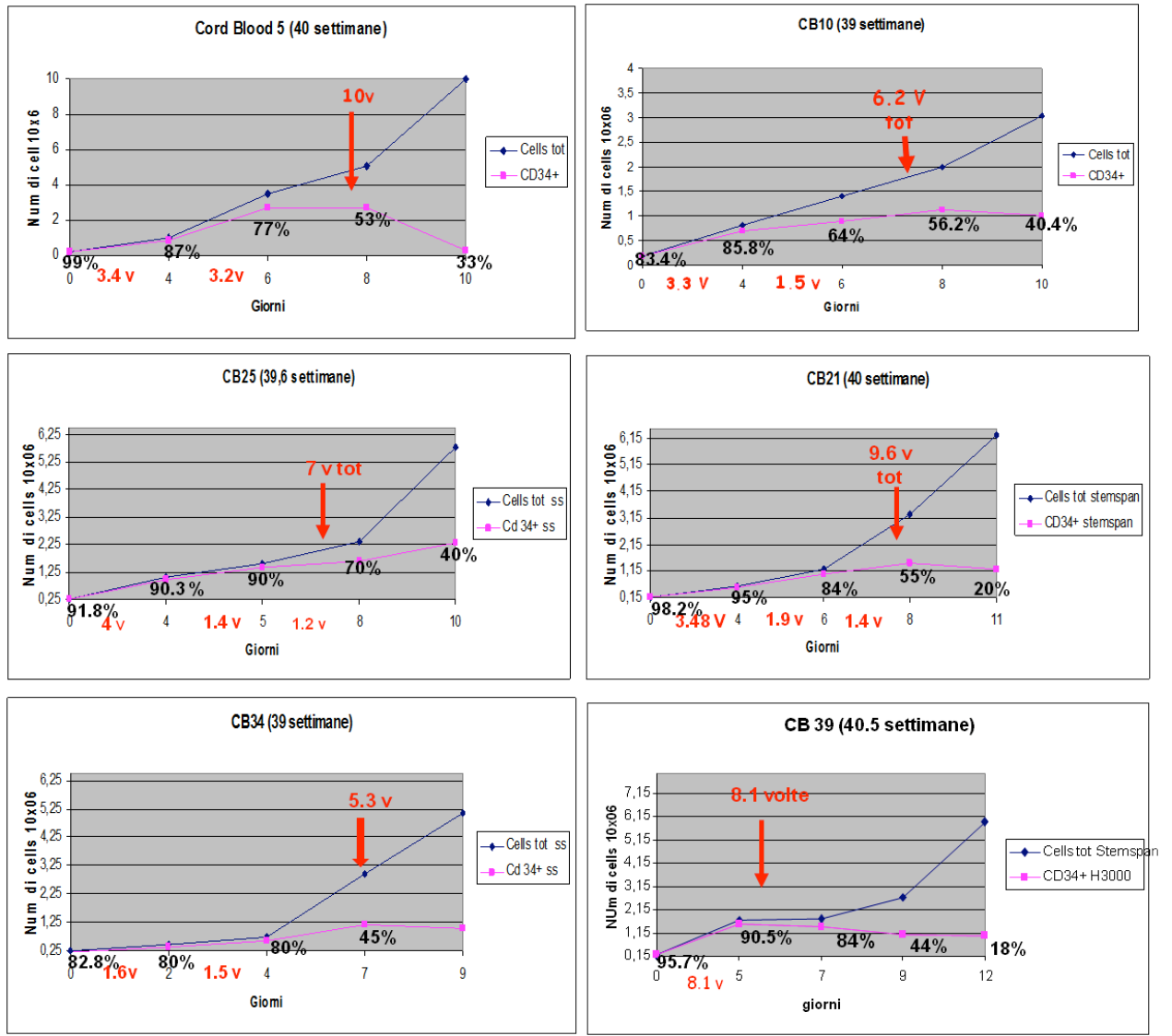
Il campione di sangue cordonale prelevato alla nascita in condizioni di sterilità è stato sottoposto a gradiente di Ficoll per isolare l'anello di mononucleati e questi incubati con biglie magnetiche coniugati con anticorpi anti-CD34, per ottenere una popolazione di cellule arricchite in CD34+. Le percentuali di cellule CD34+ e il grado di purezza sono ricadute entro i range descritti dal produttore ( Milteny) ( vedi sessione materiali e metodi).

$3 \times 10^5$  cellule sono state messe in terreno di espansione ( Stem Span Sfem + CC110) e il campione è stato analizzato a giorni 0, 4, 6 e 8 di coltura misurando sia il numero assoluto di cellule CD34+ che la loro percentuale nella coltura. In Fig. è riportato il profilo di espansione del CB numero 10 prelevato alla 39 settimana di gestazione .



**Fig.8.** Profilo di espansione del campione di sangue cordonale n°10 (CB 10)

Come si può osservare al quarto giorno di espansione il numero di CD34+ è aumentato di 3,3 volte (3,3V); e la percentuale di CD34 rimane pressoché invariata (85%). La curva mostra un massimo di amplificazione di 6,2 volte al sesto giorno, quando però si osserva una percentuale minore di cellule staminali CD34+ ( 64 %). In maniera analoga sono stati costruiti profili di espansione di 6 esperimenti (fig.9).



**Fig. 9.** Profili di espansione di HSC in coltura. In ascissa è riportato il numero di cellule  $\times 10^6$ , in ordinate sono riportati i giorni dell'analisi (le % delle CD34+ relative ad ogni giorno di analisi sono indicate all'interno del grafico ed il grado di espansione di ciascun intervallo di 2gg è indicato con la lettera V).

## Caratterizzazione fenotipica delle cellule espanse

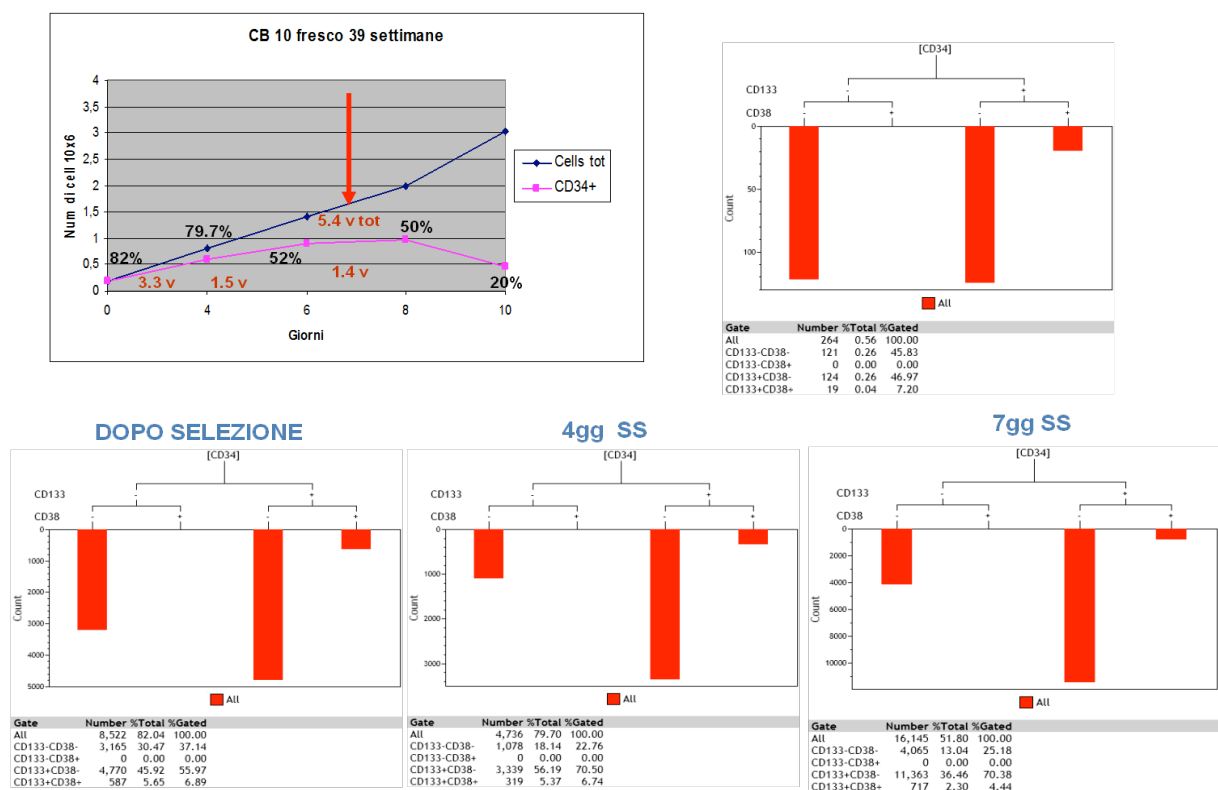
Nei giorni 0, 4° e 8° di coltura è stata condotta l'analisi fenotipica di queste popolazioni cellulari, in particolare, è stata analizzata, all'interno del pool cellulare CD34+ la quota di cellule che co-esprimevano l'antigene di superficie CD133, che compare prima del CD34 durante l'ematopoiesi, e l'antigene CD38, che è presente in tutte le cellule direzionate verso varie linee ( Lin+ ). L'elaborazione è riportata in sessione materiali e metodi e le popolazioni analizzate sono in particolare :

✓C34+/CD133+/CD38-

✓C34+/CD133+/CD38+

✓C34+/CD133-/CD38-

✓C34+/CD133-/CD38+

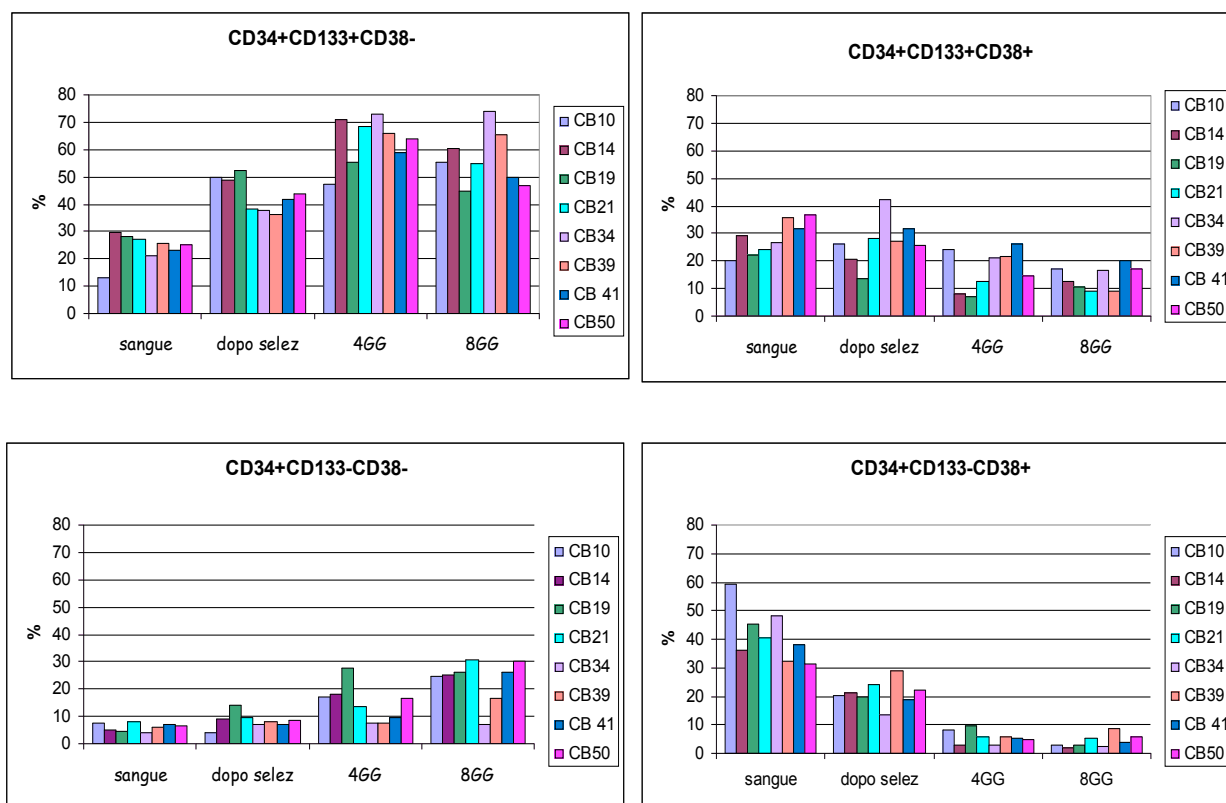


**Fig.10.** Rappresentazione del grafico di espansione e delle percentuali delle popolazioni di cellule positive e/o negative per antigeni CD34, CD133 e CD38 mediante il programma di analisi Kaluza.

In figura 10 è riportata questo tipo di analisi nel campione CB10 ( a 39 settimane) nel sangue cordonale nelle cellule CD34+ subito dopo la selezione, al giorno 0 al 4° e 8° giorno di espansione.

È possibile notare come al 4° giorno di amplificazione il tipo cellulare che si è espanso è rappresentato dalle cellule CD34+/CD133+/CD38- (da 55% a 70%), fenotipo che è caratteristico di cellule staminali precoci multipotenti. La percentuale di cellule rimane invariata all'8° giorno di coltura (70%), giorno però nel quale in generale la percentuale nella popolazione di CD34+ diminuisce (56,2%). Di contro le popolazioni che contengono il marcatore di differenziamento CD34+/CD133+/CD38+ e CD34+/CD133-/CD38+ diminuiscono nel corso della coltura (4° e 8° giorno).

La stessa analisi è stata condotta in altri 7 campioni e nella figura 11 sono riportati i risultati ottenuti in ognuno di essi.

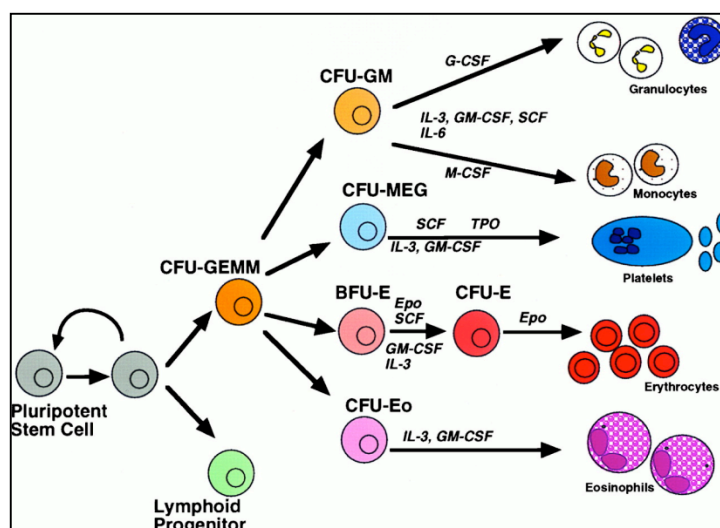


**Fig.11.** Tipizzazione fenotipica di sottopopolazioni di cellule CD34+.

Sopra ogni grafico è descritto il tipo cellulare: C34+/CD133+/CD38-; C34+/CD133+/CD38+; C34+/CD133-/CD38-; C34+/CD133-/CD38+. Ogni sottopopolazione è stata analizzata nel sangue, al giorno 0 (subito dopo selezione), al giorno 4° e 8° di coltura.

## Saggio clonogenico in supporto semisolido di metilcellulosa

La percentuale delle colonie sviluppate in metilcellulosa a diversi giorni di coltura (0,4° e 8° giorno) dimostra che almeno fino al 4° giorno la percentuale delle colonie più primitive (CFU-GEMM), capaci ancora di generare cellule sia della linea rossa che della linea bianca (Fig12), si mantiene pressoché invariata ( $13,53 \pm 3,28$  al giorno 0 vs  $12 \pm 3,77$  al 4° giorno) Tabella 3.



**Fig.12.** Schema dell'ematopoiesi in cui sono indicate le cellule da cui derivano le corrispondenti colonie.

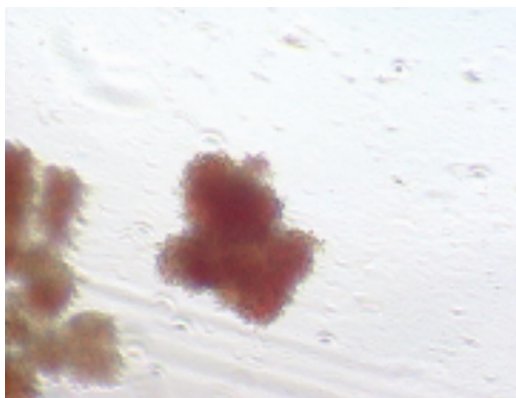
Colonie in Metilcellulosa	giorno 0	giorno 4	giorno 8
CFU-M	$37,16 \pm 8,28$	$36,86 \pm 2,13$	$50,56 \pm 3,14$
CFU-G	$7,9 \pm 1,8$	$13,5 \pm 6,24$	$19,53 \pm 8,40$
CFU-GM	$27,3 \pm 8,6$	$23,1 \pm 6,08$	$23,33 \pm 12,28$
CFU-GEMM	$13,53 \pm 3,28$	$12 \pm 3,77$	$2,6 \pm 1,99$
BFU-E	$13,9 \pm 4,43$	$14,33 \pm 2,62$	$3,7 \pm 4,33$

**Tabella3:** Schema rappresentativo del numero di colonie medie ottenute dal saggio di formazione delle colonie su metilcellulosa, a giorno zero, al 4° e 8° giorno di espansione.

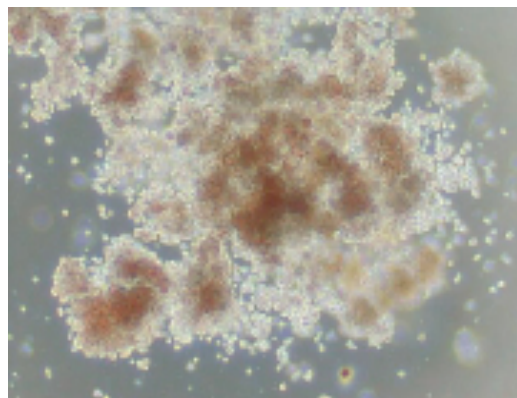


All'ottavo giorno di coltura il saggio clonogenico mostra una più alta percentuale di colonie generate da progenitori più maturi, infatti aumentano le colonie di granulociti e monociti e diminuiscono drasticamente le colonie di progenitori capaci ancora di generare sia granulociti che cellule eritroide che monociti (colonie GEMM). In figura 14 sono mostrati le immagini di esempio delle varie tipologie di colonie

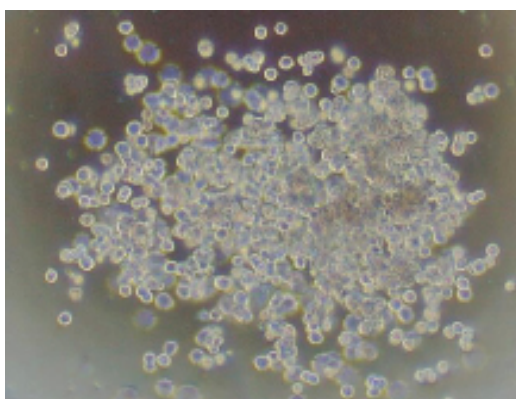
BFU-E



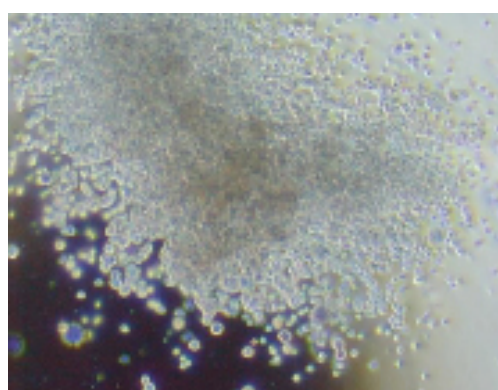
CFU-GEMM



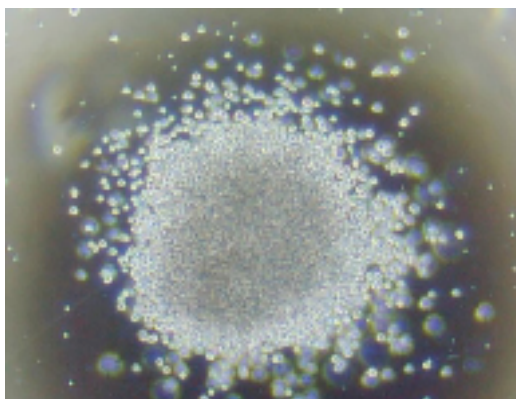
CFU-M



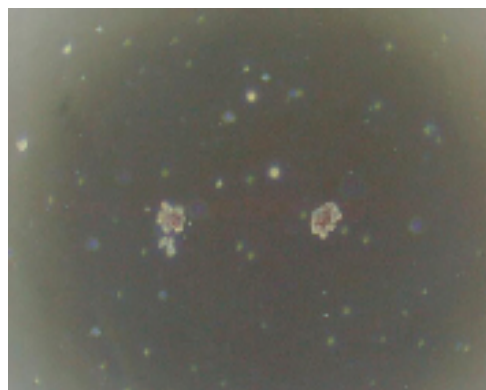
CFU-GM



CFU-G



CFU-E

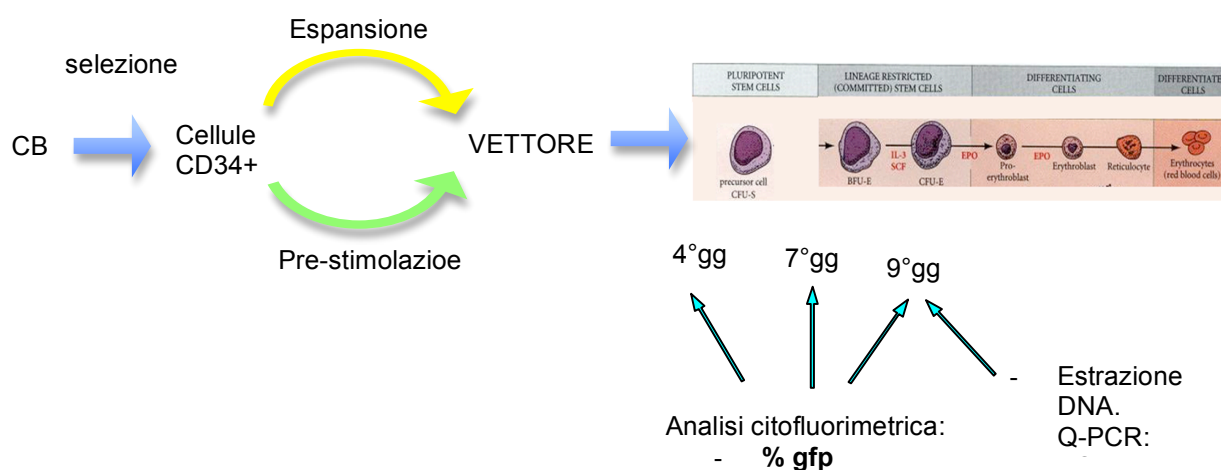


**Fig.13.** Esempi dei vari tipi di colonie su metil-cellulosa.(tratto da atlante di stem cell technologies 2010).

## Valutazione dell'efficienza di trasduzione delle cellule in fase di espansione con un vettore lentivirale.

Sulla base dei dati fin qui riportati si è deciso di trans-infettare al 4° giorno di espansione, quando cioè conservano ancora le maggiori caratteristiche di staminalità, e l'efficienza di infezione ed il numero di copie di vettore per cellula sono state paragonate a quelle ottenute trans-infettando le stesse cellule alle condizioni stabilite nella prima parte della tesi secondo il "cocktail classico" (prestimolazione per 24 h con SCF, TPO, e FLT 3 (100ng/ml)+ IL-3 (20 ng/ml)).

E' stato usato il vettore LV-GFP a MOI 5, molto notevolmente più basso a quello usato per le cellule HSC adulte perché come riportato in letteratura ..... le HSC da CB sono più facilmente trasfettabili.



**Fig.14.** Piano sperimentale.

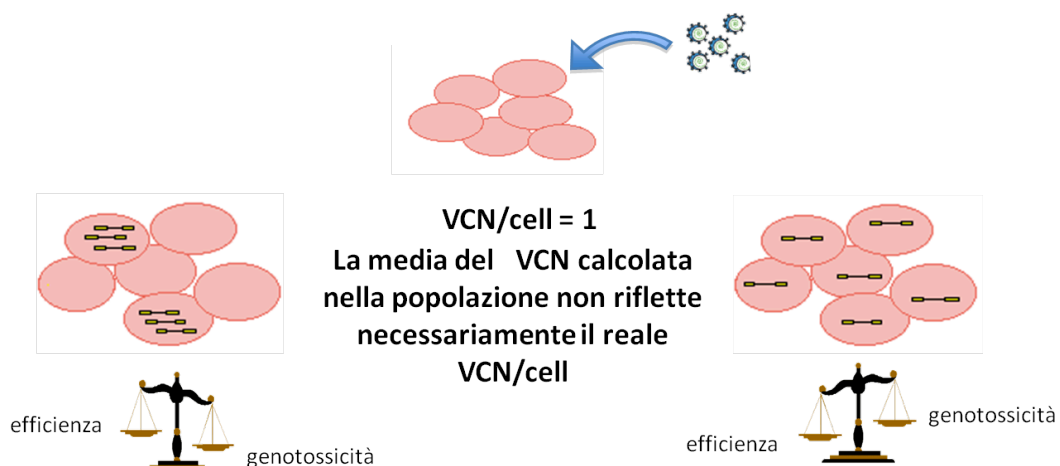
In figura 14 è raffigurato il piano sperimentale:  $3 \times 10^5$  cellule CD34+ sono state prestimate per 24h in un cocktail di citochine o espanse per 4 giorni alle condizioni già descritte. Dopo 12 ore di contatto con il virus le cellule sono state fatte crescere in terreni di coltura contenenti fattori di crescita e componenti specifiche per differenziarle in senso eritroide (colture eritroide in fase liquida).

Dopo 12 giorni di coltura veniva rivelato: la percentuale di cellule fluorescenti (GFP+) e il livello dell'espressione del transgene (GFP) mediante la misura del valore del MFI e il numero medio di vettore per cellula mediante Q-PCR.

	MOI	% GFP	MFI	VCN/CELL
cellule inPrestim. Classica SCF, TPO, e FLT3 ( 100ng/ml)+ IL-3 (20 ng/ml)	5	22%	46,8	0,67
cellule inPrestim. Classica SCF, TPO, e FLT3 ( 100ng/ml)+ IL-3 (20 ng/ml)	5	25%	50,3	0,85
espansione Stem Span® SFEM+ CC110	5	32,7%	34	1
espansione Stem Span® SFEM+ CC110	5	31,2%	28,8	0,86
espansione Stem Span® SFEM+ CC110	5	34,6%	31	0,86
espansione Stem Span® SFEM+ CC110	5	42,8%	38,9	1,3

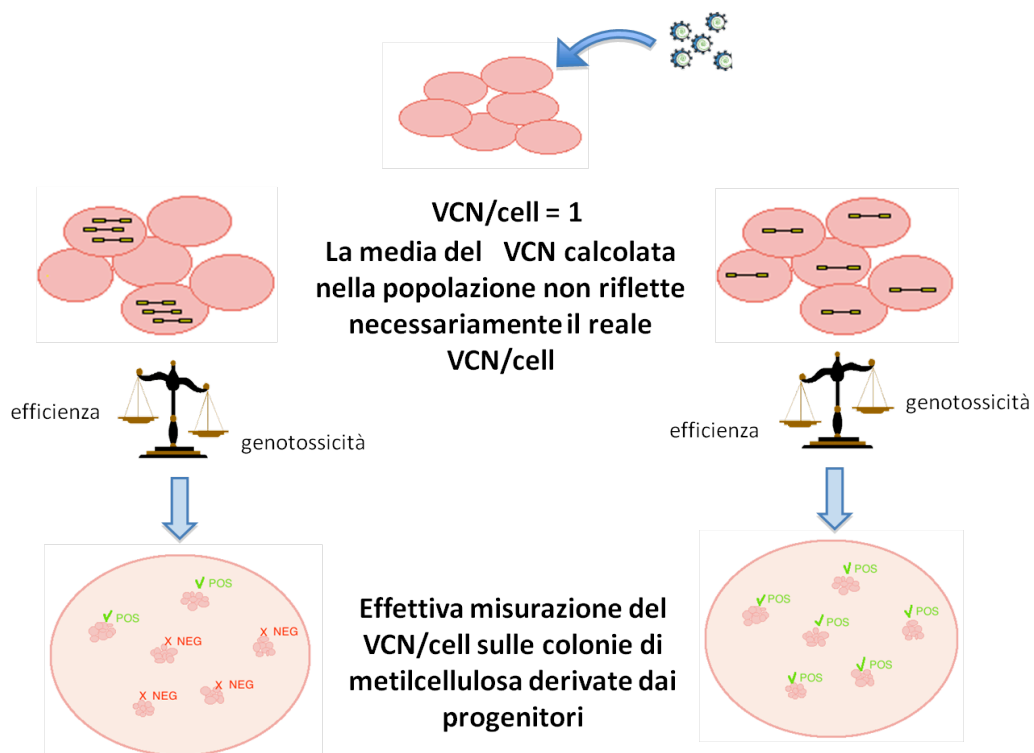
**Tabella 4.** Efficienza di traduzione sia in cellule in prestimolazione classica che in espansione. MFI= intensità della fluorescenza media della GFP; VCN/CELL= numero di copie di vettore per cellula ; MOI= molteplicità d'infezione

La tabella 4 riporta quattro reazioni di trans-infezione in cellule in espansione e due reazioni di trans-infezione classica. I risultati mostrano che a parità di MOI la percentuale di cellule GFP + è maggiore nelle cellule in espansione rispetto alle cellule in pre-stimolazione, con valori di MFI medio minore rispetto a queste ultime. Il valore medio del numero di copie di vettore per cellula (VCN/Cell) rivelato nel pool cellulare non sono molto differenti, ma questo tipo di misurazione non rivela la distribuzione di queste copie di vettore, in quanto per es. un VCN=1 può essere determinato da due possibili situazioni descritte nella fig 15 dove o poche cellule contengono molte copie di vettore o viceversa.



**Fig.15.** Sono descritte i possibili profili di distribuzione del vettore a parità di VCN=1 (produzione propria)

Per discriminare tra le due situazioni è necessario approfondire l'analisi andando a determinare l'effettiva distribuzione del vettore all'interno di ogni cellula. Questo è possibile seminando un certo numero di progenitori subito dopo la trans-infezione e facendole sviluppare in colonie in metilcellulosa. Dopo 2 settimane è possibile analizzare ogni colonia per la percentuale di fluorescenza GFP e per il numero di copie di vettore (sono state analizzate 50 colonie per esperimento).



**Fig.16.** è schematizzato l'esempio di una trasduzione in cui il NCV/cell risulta 1, con i possibili profili di distribuzione del vettore: a) molte copie di vettore sono inserite nel genoma della stessa cellula; b) lo stesso numero di copie di vettore è distribuito in più cellule. Tramite saggio clonale su metilcellulosa è possibile correggere NCV/cell (produzione propria).

Questo è stato effettivamente fatto in 3 degli esperimenti riportati in tab.4 ed i risultati sono riassunti in fig.17.

	MOI	% GFP	MFI	VCN/CELL	
cellule inPrestim. Classica SCF, TPO, e FLT3 (100ng/ml)+ IL-3 (20 ng/ml)	5	22%	46,8	0,67	
cellule inPrestim. Classica SCF, TPO, e FLT3 (100ng/ml)+ IL-3 (20 ng/ml)	5	25%	50,3	0,85	→ •65% da 3 a 7 copie •20% 2 copie •15% 1 copia
espansione Stem Span® SFEM+ CC110	5	32,7%	34	1	
espansione Stem Span® SFEM+ CC110	5	31,2%	28,8	0,86	→ •10% 3 copie •20% 2 copie •70% 1 copia
espansione Stem Span® SFEM+ CC110	5	34,6%	31	0,86	→
espansione Stem Span® SFEM+ CC110	5	42,8%	38,9	1,3	

**Fig.17** Analisi della percentuale di GFP e del VCN all'interno di ogni singola colonia

I risultati mostrano che le condizioni di prestimolazione classica producono cellule che contengono molteplici copie di vettori, come del resto era evidente dai valori più alti della fluorescenza (MFI valori di espressione GFP); mentre se si trans-infettano le cellule in attiva fase di divisione molte più cellule vengono trans-infettate con la risultante che il vettore è meglio distribuito, il 35% delle cellule in pre-stimolazione classica contro il 90% di cellule in espansione contiene da 1 a 2 copie, che è il range raccomandato in questo tipo di terapia per diminuire il rischio di oncogenesi inserzionale.

Altri esperimenti sono in corso per confermare questo dato che rappresenta un importante risultato per delineare protocolli ottimali in questo tipo di terapia genica. Ovviamente prima di essere applicata in vivo è necessario condurre analisi più dettagliate al fine di:

- ✓ escludere che le cellule così manipolate generano per se cellule potenzialmente cancerogene ( analisi dei profili di espressione mediante array)
- ✓ che le cellule così manipolate abbiano ancora lo stesso potenziale di staminalità ( saggi di ricostituzione ematopietiche in vivo nel modello animale)

*Discussione*

Uno dei maggiori problemi che si riscontra nelle terapie geniche per la correzione di cellule staminali ematopoietiche (HSC) consiste nella difficoltà di rendere tali cellule ricettive alla trans-infezione pur preservandone il potenziale clonogenico, e di limitare al minimo nello stesso tempo il numero di vettori che si integrano in ogni genoma cellulare. Per una terapia efficace e sicura, quindi è necessario riuscire a modificare il maggior numero di HSC con il minor numero di copie di vettore per cellula ( 1-2 copie) per minimizzare eventuali eventi di mutagenesi inserzionali ed avere un numero di cellule modificate sufficiente per poter ricostituire il midollo di un paziente .

Per ottenere questa particolare condizione devono essere ottimizzati i parametri che influenzano la reazione di trans-infezione in provetta . Per questo motivo considerando che le HSC sono cellule non totalmente permissive e in uno stato simil quiescente , si sono condotti diversi esperimenti con l'intento di indurre le cellule ad entrare in un fase di transizione G0- G1 del ciclo cellulare, senza inficiare la capacità clono genica, e nello stesso tempo misurando l'effettivo grado di transgenesi, sia considerando la % di cellule contenenti il vettore che considerando il numero di vettori integrati in ogni genoma. Sono stati condotti diversi esperimenti in cui si sono modificati uno per volta il cocktail di citochine , oltre che i tempi di trans infezione, le concentrazioni virale (MOI), e le dosi virali per stabilire le condizioni migliori e si è giunti alla conclusione che queste sono costituite da un cocktail di citochine così fatto *SCF*, *TPO* e *FL-3* (c.f. *100ng/ul*), *IL-3* (*20 ng/ul*), per una prestimolazione della durata di *12 ore*, con una sola dose virale di *8-12 ore* ad un *moi* di *30*. In queste condizioni si produce una percentuale di cellule HSC (Adulte da midollo osseo) modificate pari a massimo il 30 % con il vettore LV-GFP (che contiene il gene reporter della green fluorescent protein ) e con un VCN medio piuttosto elevato ( da 3 a 5 copie di vettore per cellula).

Questo grado di correzione è soddisfacente per quanto riguarda la cura di alcune patologie ematologiche genetiche ereditarie , come la talassemia, dove un tale chimerismo produrrebbe una quantità del prodotto deficitario, in questo caso della beta globina, sufficiente per curare il paziente. Dall'altro lato però non soddisfacente dal punto di vista della sicurezza in quanto nelle condizioni migliori (20-30% di cellule modificate) si trova sempre un numero di copie elevato (da 3 a 5 copie di vettore per cellula). Se però si cercava di abbassare il rapporto virus/cellula ( moi 30 fino a 5) diminuiva la percentuale di cellule modificate. Questo può essere indicativo del fatto che le condizioni di trans-infezione usate non riuscivano a portare la stragrande maggioranza delle cellule a essere ricettive per il vettore e determinavano un eccesso di particelle virali nelle poche cellule ricettive.



A questo punto della tesi è sorta l'esigenza di modificare drasticamente le condizioni di trans-infezione non seguendo il cocktail classico di prestimolazione, come riportato in letteratura ma espandendo le cellule in provetta e operando la trans-infezione durante la divisione cellulare.

Oggi esistono diversi terreni sintetici, privi di siero e suscettibili di essere usati in protocolli clinici, e cocktail di citochine specifici delle HSC che mantengono queste in uno stato di pluripotenza. E' stato usato un terreno e un cocktail di citochine della Stem Cell Technologies per espandere HSC da sangue di cordone ombelicale (CB) alla nascita. La scelta delle HSC da CB è stata anche stimolata dall'idea affascinante di poter in futuro curare bambini che nascono affetti da malattie genetiche modificando le HSC del loro cordone ombelicale e conservando questo "farmaco biologico" per un trapianto autologo non appena gli stessi bambini sono in età e in condizioni cliniche ottimali.

Pertanto ho in un primo momento espanso le HSC di 8 campioni di CB e li ho caratterizzati a diversi giorni di coltura (0,4 e 8 giorni) sia per il numero di CD34+ assoluto e per la percentuale di CD34+ presenti durante la coltura, che per la loro capacità di originare colonie in supporti di metilcellulosa, andando anche a verificare negli stessi giorni la presenza di antigeni di superficie di staminalità, come CD133, e di differenziamento, come CD38.

In tutti i campioni si è avuto un grado di espansione di CD34+ di 3,5 volte al 4° giorno di coltura e a tale giorno la % di CD34+ rimane pressoché invariata. A 4 giorni di coltura inoltre tali cellule mantengono ancora lo stesso potenziale clonogenico, visto come percentuale di colonie più immature (CFU-GEMM), delle cellule non manipolate, in oltre dall'analisi dell'espressione degli antigeni di superficie queste cellule esprimono ancora i marcatori di staminalità (CD133+).

Alla luce di ciò ho condotto esperimenti di trans-infezione in HSC al 4° giorno di espansione paragonando l'efficienza di trans-infezione con HSC prestimate secondo le condizioni classiche, utilizzando moi via via decrescenti. Il risultato è stato entusiasmante in quanto già a MOI 5 una buona percentuale di cellule in espansione erano trans-infettate e contenevano un VCN/ cellule basso rispetto a quanto visto in precedenza. Questo è un importante risultato per tutte le Terapie Geniche che hanno come obiettivo quello di modificare stabilmente il maggior numero di cellule HSC che si trovano in uno stato quiescente, mantenendo al contempo un basso numero di copie di vettore per cellula, onde ridurre al minimo eventuali eventi di mutagenesi inserzionale senza modificare la loro capacità di generare tutti i tipi di progenitori in vitro.

Questi risultati se confermati da test in vivo (ricostituzione a lungo termine di midolli in sistemi animali) costituiscono un grande passo avanti per queste terapie d'avanguardia.

## *Bibliografia*

Abbas ,Lichtman and Prober . Cellular and Molecular Immunology. W.B. Saunders. 1999 fig 2-7.

Atlas of Hematopoietic colonies from cord blood Stem Cell technologies. Marzo 2010.

Avedillo Díez I, Zychlinski D, Coci EG, Galla M, Modlich U, Dewey RA, Schwarzer A, Maetzig T, Mpofu N, Jaeckel E, Boztug K, Baum C, Klein C, Schambach A. Development of novel efficient SIN vectors with improved safety features for Wiskott-Aldrich syndrome stem cell based gene therapy. *Mol Pharm*. 2011 Oct 3;8(5):1525-37. Epub 2011 Aug 31.

Bank A, Dorazio R, Leboulch P. A phase I/II clinical trial of beta-globin gene therapy for beta-thalassemia. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1054:308-16.

Bao L, Jaligam V, Zhang XY, Kutner RH, Kantrow SP, Reiser J. Stable transgene expression in tumors and metastases after transduction with lentiviral vectors based on human immunodeficiency virus type 1. *Hum Gene Ther*. 2004 May;15(5):445-56.

Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE, Blazar BR, McGlave PB, Miller JS, Verfaillie CM, Wagner JE. Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood*. 2005;105(3):1343-1347.

Cartier N, Hacein-Bey-Abina S, Bartholomae CC, Bougnères P, Schmidt M, Kalle CV, Fischer A, Cavazzana-Calvo M, Aubourg P. Lentiviral hematopoietic cell gene therapy for X-linked adrenoleukodystrophy. *Methods Enzymol*. 2012;507:187-98.

Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, Selz F, Hue C, Certain S, Casanova JL, Bousso P, Deist FL, Fischer A. 2000. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. 2000. *Science*. 288:669-672.

Cavazzana-Calvo M, Payen E, Negre O, Wang G, Hehir K, Fusil F, Down J, Denaro M, Brady T, Westerman K, Cavallese R, Gillet-LeGrand B, Caccavelli L, Sgarra R, Maouche-Chrétien L, Bernaudin F, Girot R, Dorazio R, Mulder GJ, Polack A, Bank A, Soulier J, Larghero J, Kabbara N, Dalle B, Gourmel B, Socie G, Chrétien S, Cartier N, Aubourg P, Fischer A, Cornetta K, Galacteros F, Beuzard Y, Gluckman E, Bushman F, Hacein-Bey-Abina S, Leboulch P. 2010. "Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human  $\beta$ -thalassaemia." *Nature*;467(7313):318-22.

Delaney C, Heimfeld S, Brashem-Stein C, Voorhies H, Manger RL, Bernstein ID. Notch-mediated expansion of human cord blood progenitor cells capable of rapid myeloid reconstitution. *Nat Med*. 2010 Feb;16(2):232-6. Epub 2010 Jan 17.

Gammaitoni L, Bruno S, Sanavio F, Gunetti M, Kollet O, Cavalloni G, Falda M, Fagioli F, Lapidot T, Aglietta M, Piacibello W. Ex vivo expansion of human adult stem cells capable of primary and secondary hemopoietic reconstitution. *Exp Hematol*. 2003 Mar;31(3):261-70.

Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, Esperou H, Thierry D, Socie G, Lehn P, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med*. 1989 Oct 26;321(17):1174-8.

. Hwang WY, Samuel M, Tan D, Koh LP, Lim W, Linn YC. A meta-analysis of unrelated donor umbilical cord blood transplantation versus unrelated donor bone marrow transplantation in adult and pediatric patients. *Biol Blood + Marrow Transplant*. 2007 Apr;13(4):444-53. Epub 2007 Feb 15. Review

Inoue H, Yasuda Y, Hattori K, Shimizu T, Matsumoto M, Yabe M, Yabe H, Tsuchida F, Tanaka Y, Hosoi G, Sako M, Kato S. The kinetics of immune reconstitution after cord blood transplantation and selected CD34+ stem cell transplantation in children: comparison with bone marrow transplantation. *Int J Hematol*. 2003 May;77(4):399-407.

Kang EM, Malech HL. Gene therapy for chronic granulomatous disease. *Methods Enzymol*. 2012;507:125-54.

Kurtzberg J, Laughlin M, Graham ML, Smith C, Olson JF, Halperin EC, Ciocchi G, Carrier C, Stevens CE, Rubinstein P. Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N Engl J Med*. 1996 Jul 18;335(3):157-66.

Maggio A. Light and shadows in the iron chelation treatment of haematological diseases. *Br J Haematol*. 2007 Aug;138(4):407-21. Review.

May C., Rivella S., Callegari J., Heller G., Gaensler K.M.L., Luzzatto L., and Sadelain M. Therapeutic haemoglobin synthesis in  $\beta$ -thalassaemic mice expressing lentivirus-encoded human  $\beta$ -globin. *NATURE* vol 406, 6. July 2000.

Montiel-Equihua CA, Thrasher AJ, Gaspar HB. Gene therapy for severe combined immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *2012 Curr Gene Ther*. 2012 Feb 1;12(1):57-65.

Ott M G, Schmidt M, Schwarzwaelder K, Stein S, Siler U, Koehl U, Glimm H, Kuhlcke K, Schilz A, Kunkel H, Naundorf S, Brinkmann A, Deichmann A, Fischer M, Ball C, Pilz I, Dunbar C, Du Y, Jenkins NA, Copeland NG, Luthi U, Hassan M, Thrasher AJ, Hoelzer D, von Kalle C, Seger R, Grez M. Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *2006 Nat Med* 12:401-409.

Petersdorf EW, Gooley TA, Anasetti C, Martin PJ, Smith AG, Mickelson EM, Woolfrey AE, Hansen JA. Optimizing outcome after unrelated marrow transplantation by comprehensive matching of HLA class I and II alleles in the donor and recipient. *Blood*. 1998 Nov 15;92(10):3515-20.

Puthenveetil G, Scholes J, Carbonell D, Qureshi N, Xia P, Zeng L, Li S, Yu Y, Hiti AL, Yee JK, Malik P. Successful correction of the human beta-thalassemia major phenotype using a lentiviral vector. *Blood*. 2004 Dec 1;104(12):3445-53. Epub 2004 Aug 3.

Rivella S, May C, Chadburn A, Rivière I, Sadelain M. A novel murine model of Cooley anemia and its rescue by lentiviral-mediated human beta-globin gene transfer. *Blood*. 2003 Apr 15;101(8):2932-9. Epub 2002 Dec 12.

Sasazuki T, Juji T, Morishima Y, Kinukawa N, Kashiwabara H, Inoko H, Yoshida T, Kimura A, Akaza T, Kamikawaji N, Kodera Y, Takaku. Effect of matching of class I HLA alleles on clinical outcome after transplantation of hematopoietic stem cells from an unrelated donor. Japan Marrow Donor Program. *N Engl J Med*. 1998 Oct 22;339(17):1177-85.

Shaw KL, Kohn DB. A tale of two SCIDs. *Sci Transl Med*. 2011 Aug 24;3(97):97ps36.

Shpall EJ, Quinones R, Giller R, Zeng C, Baron AE, Jones RB, Bearman SI, Nieto Y, Freed B, Madinger N, Hogan CJ, Slat-Vasquez V, Russell P, Blunk B, Schissel D, Hild E, Malcolm J, Ward W, McNiece IK. Transplantation of ex vivo expanded cord blood. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2002;8(7):368-76.

Sideri A, Neokleous N, De La Grange PB, Guerton B, Le Bousse Kerdilles MC, Uzan G, Peste-Tsilimidos C, Gluckman E. An overview of the progress on double umbilical cord blood transplantation *Haematologica*. 2011 Aug;96(8):1213-20. Epub 2011 May 5. Review.

Takizawa H, Schanz U, Manz MG. Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells: mission accomplished? *Swiss Med Wkly*. 2011 Dec 29;141:w13316. doi: 10.4414/sm.w.2011.13316.

Ueda T, Yoshida M, Yoshino H, Kobayashi K, Kawahata M, Ebihara Y, Ito M, Asano S, Nakahata T, Tsuji K. Hematopoietic Capability of CD34+ Cord Blood Cells: A Comparison With CD34+ Adult Bone Marrow Cells

Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol*. 2006 Feb;6(2):93-106. Review.

Yannaki E, Emery DW, Stamatoyannopoulos G. Gene therapy for  $\beta$ -thalassaemia: the continuing challenge. *Expert Rev Mol Med*. 2010 Oct 1;12:e31. Review.

Young HE, Black AC Jr. Adult stem cells. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. Jan;276(1):75-102 (2004).